

THÈSES

présentées à la
FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)
par
Jean SCHUSTER
Pharmacien
Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris

1^{re} THÈSE :

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES DANS LA SÉRIE DES COLCHICINIQUES

"Obtention et mise en évidence, notamment par l'étude de la cytotoxicité sur cultures cellulaires, d'anticorps actifs contre les effets toxiques et antimitotiques d'un dérivé de la N-désacétylthiocolchicine".

2^{me} THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 10 octobre 1964

JURY : MM. R. TRUHAUT - Président

A. GERMAN
G. DEYSSON Examineurs

THÈSES

présentées à la
FACULTÉ DE PHARMACIE
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
pour l'obtention du grade de
DOCTEUR EN PHARMACIE
(Diplôme d'Etat)

par

Jean SCHUSTER

Pharmacien

Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Assistant à la Faculté de Pharmacie de Paris

1^{re} THÈSE :

RECHERCHES IMMUNOLOGIQUES DANS LA SÉRIE DES COLCHICINIQUES

"Obtention et mise en évidence, notamment par l'étude de la cytotoxicité sur cultures cellulaires, d'anticorps actifs contre les effets toxiques et antimitotiques d'un dérivé de la N-désacétylthiocolchicine".

2^{me} THÈSE :

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 10 octobre 1964

JURY : MM. R. TRUHAUT - Président

A. GERMAN

G. DEYSSON Examineurs



PERSONNEL DE LA
FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS.

ADMINISTRATION

M. G. VALETTE.....	Doyen.
M. M.M. JANOT	Assesseur.
M. P. MALANGEAU ...	Assesseur.
M. L. RODINEAU	Secrétaire Général.
Mme S. FERRARI	Attachée Principale.
M. L. JEANDEL	Attaché.
Mme C. PEILLON	Attachée.
Mle G. BIDEAU	Secrétaire.
Mme S. CERTAIN	Secrétaire.
Mme M. COUSIN	Secrétaire.
M. A. DROUILLY	Secrétaire.
Mme M.L. ESPINASSE.	Secrétaire.
Mle A.M. FAVERJON ..	Secrétaire.
M. G. FROISSART ...	Secrétaire.
Mme L. WARNESSON ..	Secrétaire.

DOYEN HONORAIRE

M. R. FABRE	Membre de l'Institut.
-------------------	-----------------------

PROFESSEURS HONORAIRES

M. M. DELEPINE	Membre de l'Institut
M. L. LAUNOY	
M. P. FLEURY	
M. M. MASCRE	
M. M. PICON	
M. C. EDEL	
M. R. FABRE	Membre de l'Institut.

PROFESSEURS

M. M.M. JANOT	Pharmacie galénique (T)
M. G. VALETTE	Pharmacodynamie (T)
M. R. PARIS	Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale (T)
M. M. GUILLOT	Physique (T)
M. J.A. GAUTIER ...	Chimie organique (T)
M ^{le} S. LAMBIN	Microbiologie (T)
M. Y. RAOUL	Physiologie (T)
M. J. COURTOIS	Chimie biologique (T)
M. L. DOMANGE	Chimie minérale (T)
M. P. CRETE	Botanique (T)
M. R. TRUHAUT	Toxicologie et hygiène industrielle (T)
M. A. MORETTE	Hydrologie (T)
M. R. CAVIER	Parasitologie (T)
M. A. QUEVAUVILLER.	Hygiène et Education sanitaire (T)
M. R. MOREAU	Pharmacie chimique (T)
M. J. GUY	Mathématiques appliquées aux sciences phy- siques et biologiques (T)
M. A. GERMAN	Virologie et Sérologie (T)
M. M. PIETTE	Biologie sanguine (T)
M. P. MALANGEAU ...	Chimie analytique (T)
M. M. GIRARD	Chimie appliquée à l'expertise (T)
M. G. DILLEMANN ...	Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T)
M. G. DEYSSON	Cytologie végétale (T)
M. J. FLAHAUT	Minéralogie (T)
M. A. LE HIR	Pharmacie galénique
M. J. RENAULT	Chimie organique (T)
M. C. BOUDENE	Toxicologie et Hygiène industrielle (T)
M. P. LARUELLE	Physique
M. P. ROSSIGNOL ...	Pharmacodynamie
M. A. MANGEOT	Pharmacie galénique industrielle
M. P. DELAVEAU	Matière médicale

MAITRES DE CONFERENCES

M. R. BOURDON	Chimie analytique
M. Y. COHEN	Sciences naturelles
M. G. LE MOAN	Sciences appliquées
M. H. RENAULT	Pharmacie chimique
M. C. PAOLETTI	Sciences appliquées
M. P. REYNAUD	Sciences physico chimiques

M. J. POISSON	Sciences naturelles
M. A. DESVIGNES ...	Cryptogamie et technique bactériologique
M. F. PERCHERON ...	Sciences appliquées
M. J. SAVEL	Biologie animale
M. J. BORY	Sciences naturelles

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

M. P. BINET	Parasitologie
M. A. CARLIER (FF).	Pharmacie galénique industrielle
M. A. CAVE	Pharmacotechnie
M. P. CORRIEZ	Physique
M. C. DREUX (FF) ..	Electrochimie appliquée à l'analyse
M. P. GESTEAU	Physique biologique
M. J.C. GOUNELLE ..	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section biologie)
M. H. GUERIN	Micrographie (3ème année) - Essais des drogues végétales
M. J. HARISPE	Chimie générale et pharmaceutique
M. J. HENRY	Chimie (4ème année)
Mme J. HUBERT	Microbiologie
Mle Y. JUND (FF) ..	Microbiologie
Mme N. LEGER (FF) .	Parasitologie
M. R. LELUC	Microbiologie
M. A. LEMONNIER	Chimie analytique (2e & 3e a)
Mle M. LOISEAU (FF)	Chimie (4ème année)
Mle S. LONGUEVALLE	Service des examens de chimie
M. J. MANDEREAU (FF)	Pharmacotechnie
Mle H. MORIN	Pharmacodynamie
M. NGUYEN PHU LICH (FF)	Toxicologie
M. F. PELLERIN	Chimie analytique (2 et 3ème a)
M. R. PERLES	Chimie biologique
M. P. POUILLAIN	Hématologie
Mme M. ROBERT	Sérologie
Mle A. ROLLEN	Biologie végétale
Mme N. SALES (FF)...	Biologie animale
Mle L. SEGUIN (FF) .	Analyse appliquée au contrôle des médicaments (section physico-chimie)
Mme M. SEILLER (FF)	Pharmacie galénique industrielle
M. J. YONGER (FF) .	Chimie analytique (1ère année)

BIBLIOTHEQUE

Mle Y. RUYSSSEN Conservateur chargée de la Direction
Mle S. LAVAUD Conservateur
Mme G. KREHMER Conservateur
Mme A. DESGRIPPES .. Bibliothécaire.

—A notre Président de Thèse

M. le Professeur TRUHAUT

"Professeur de Toxicologie et d'Hygiène industrielle à la Faculté de Pharmacie de Paris,
"Pharmacien en chef des hôpitaux psychiatriques de la Seine,

"Directeur de l'Unité de Chimiothérapie de l'Institut Gustave Roussy,

"Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a confié l'étude de la désacétylthiocolchicine et nous a guidé de ses très précieux conseils au cours de ce travail. Nous ne saurions oublier l'affection qu'il nous a toujours manifestée, les liens qui l'unissent à notre famille, ni les encouragements qu'il nous a toujours prodigués. Qu'il soit assuré de notre respectueuse reconnaissance et de notre affectueux et profond attachement.

A notre Maître,

M. le Professeur A. GERMAN

"Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
(Virologie et Immunologie)

"Pharmacien en chef des Hôpitaux de Paris.

*Qui, après nous avoir confié le sujet de ce travail,
nous a permis de persévérer dans cette tâche grâce
aux conseils éclairés qu'il nous a prodigués avec sa
haute compétence et avec tant de bienveillance. Il
a été notre premier Maître à l'Internat et n'a cessé
depuis six années de diriger constamment nos recher-
ches : nous sommes fiers d'être son élève Qu'il
veuille bien trouver ici l'assurance de notre res-
pectueuse et affectueuse reconnaissance.*

A M. le Professeur G. DEYSSON

"Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris
(Cytologie végétale).

*Qui a bien voulu nous faire l'honneur de faire
partie du jury de cette thèse.*

En témoignage de notre sincère gratitude.

A mon père, le Docteur G. SCHUSTER
de la Faculté de Pharmacie de Paris
Membre de l'Académie de Pharmacie
Chef de Laboratoire des Hôpitaux de la Seine

*Qui m'a enseigné mes premières notions de Pharmacie
et n'a cessé par la suite de m'encourager et de me
guider.*

*Avec toute ma reconnaissance et ma profonde affec-
tion.*

Au Docteur J. PANOUSE - PERRIN, Assistante au Laboratoire de Virologie et Immunologie, qui, grâce à son expérience et à son dynamisme, nous a été d'une aide si efficace en de nombreuses occasions au cours de ce travail.

Au Docteur TRAN BA LOC, Directeur adjoint du Centre de Recherches de Virologie et de Chimiothérapie de la Salpêtrière, qui nous a aidé de ses précieux conseils pour mener à bien la partie chimique de ces recherches.

A Ceux qui, dans le Service de M. le Professeur GERMAN, nous ont initié et dirigé au cours de nos années d'Internat, à Bicêtre puis à la Salpêtrière

A nos Camarades d'Internat et du Laboratoire de Virologie et Immunologie qui nous ont permis de travailler dans une ambiance si vivante et si attachante.

A mes Parents,

En témoignage de ma reconnaissance et de ma profonde affection.

A ma femme, A mes enfants,

Avec toute mon affection.

A ma famille

A mes Amis

INTRODUCTION

Une substance est dite antigénique ou immunogénique, lorsque, introduite par voie parentérale dans l'organisme d'un animal, elle provoque chez ce dernier, l'apparition d'anticorps. De nombreux produits ont été utilisés expérimentalement dans ce but, mais il n'est pas encore possible à l'heure actuelle d'énoncer de façon précise, les propriétés indispensables pour qu'une substance possède des qualités antigéniques. On sait que les protéines, à condition que leur poids moléculaire soit suffisamment élevé, et qu'elles soient étrangères à l'organisme receveur, constituent les meilleurs antigènes. Les produits chimiques ne sont par contre que très rarement immunogéniques, ou tout au moins ne donnent habituellement pas naissance à des anticorps décelables. Il est pourtant extrêmement intéressant de connaître le devenir de ces produits et par là même de certains médicaments dans l'organisme : peuvent-ils engendrer des réactions immunitaires et se trouver ainsi partiellement neutralisés après un temps plus ou moins long d'administration ?

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de savoir si l'administration prolongée d'un produit chimique, d'activité déterminée, à des animaux de laboratoire, était capable d'engendrer chez ces derniers la formation d'anticorps et si les anticorps ainsi formés pouvaient assurer une protection réelle contre l'activité de cette substance. Nous avons utilisé dans ce but la technique des azoprotéines décrite par Landsteiner et coll. et qui a permis à ces auteurs la réalisation d'un très grand nombre de travaux sur la spécificité antigénique. Nous avons ainsi pu rendre immunogénique un dérivé de la colchicine dont nous avons par ailleurs étudié l'activité et la toxicité, après avoir démontré la présence d'anticorps spécifiques dans le sérum des animaux immunisés, nous avons étudié la protection ainsi obtenue contre le dérivé de la colchicine, ceci *in vivo* chez la souris et *in vitro* grâce à une technique personnelle de protection sur culture cellulaire d'embryons de poulets.

Avant d'aborder l'exposé de ce travail, nous voudrions remercier nos Maîtres, M. le Professeur TRUHAUT et M. le Professeur GERMAN, qui nous ont dirigé et nous ont prodigué leurs conseils si précieux, tout au long de ce travail. Qu'ils soient assurés de notre très respectueuse reconnaissance et de notre affectueux et profond attachement.

A M. le Professeur DEYSSON, qui a bien voulu nous faire l'honneur de faire partie du jury de cette thèse, nous tenons à exprimer nos sentiments de très sincère gratitude.

Qu'il nous soit permis de rappeler brièvement les circonstances qui ont amené la réalisation de ce travail, et décidé de son orientation.

M. le Professeur GERMAN devait nous confier un sujet d'Immunologie, tandis qu'Interne, nous entrions dans son service, alors à l'Hôpital de Bicêtre. Par la suite, la pratique, sous sa Haute Compétence, au Laboratoire de Sérologie de la Salpêtrière, nous a permis de compléter notre expérience dans ce domaine.

Lorsque le problème s'est posé pour nous, de choisir un produit dont l'action cytotoxique fut particulièrement intéressante, il fut tout naturel, en raison de l'affection dont il nous a toujours entouré, que nous nous adressions à la Très Haute Compétence de M. le Professeur TRUHAUT, qui nous confia alors l'étude de la N-désacétylthiocolchicine. Ce produit est, en effet, le plus valable dans la série des Colchiciniques, comme l'ont montré les très nombreux travaux dans ce domaine de M. le Professeur TRUHAUT et de son Ecole: ceci tant du point de vue clinique qu'après étude de l'activité antimitotique in vitro, notamment par MM. les Professeurs TRUHAUT et DEYSSON, sur cultures cellulaires végétales.

Ce travail s'inscrit donc à la fois sous le signe de la Toxicologie et de l'Immunologie, et a particulièrement retenu notre attention en raison de l'intérêt qui s'attache à la considération des aspects immunologiques des problèmes de toxicité.

*

*

*

Un antigène est une substance qui, injectée à un animal artificiellement ou pénétrant dans l'organisme par des mécanismes naturels provoque une réaction immunitaire. Cette substance doit être en règle générale, distincte des constituants de l'animal immunisé : en effet, le pouvoir antigénique est sous la dépendance de la structure génétique de l'individu qui fournit les antigènes, et de l'individu auquel on les injecte; lorsque ces deux individus sont homologues, ils sont généralement incapables de fournir l'un contre l'autre une réaction immunitaire. En dehors de ces conditions générales, la nature même de la substance en cause intervient : les antigènes sont des substances relativement complexes, de poids moléculaire assez élevé, généralement supérieur à 5.000. Si certains produits de faible poids moléculaire sont capables de provoquer l'apparition d'anticorps, c'est qu'en réalité, ils ont la propriété de se combiner avec les protéines de l'organisme et d'être ainsi transformés en dérivés de poids moléculaire élevé (22).

Les substances immunogéniques capables de donner naissance à des anticorps appartiennent principalement au groupe des protéines et des polysaccharides. De nombreuses études immunologiques ont porté sur des protéines simples, de structure maintenant connue, telles l'insuline ou les protéines du virus de la mosaïque du tabac. L'ovalbumine ou les globulines, de préférence à la sérum-albumine constituent cependant les meilleurs antigènes. Ces dernières substances sont donc souvent utilisées pour préparer les antigènes artificiels. (2, 18, 25, 45, 16; 62, 63, 66).

Les polysaccharides sont antigéniques chez certaines espèces animales, en particulier chez la souris et chez l'homme. Ceux d'origine bactérienne ont été très étudiés, notamment dans le cas des pneumocoques, des entérobactéries ou de Leuconostoc mesentéroïdes.

Les importants travaux d'Heidelberger, Avery, Goebel et collaborateurs (24, 33) ont montré que les cocci encapsulés des 4 types de pneumocoques (I, II, III et IV) possèdent 4 antigènes glucidiques dont l'activité sérologique est spécifique du type microbien. Par contre, les lipides purs semblent jusqu'à présent dépourvus de pouvoir antigénique propre.

Les antigènes ont la propriété fondamentale de se combiner spécifiquement avec les anticorps auxquels ils ont donné nais-

sance. Cette spécificité est conditionnée par une faible région de la surface totale de l'antigène; c'est le déterminant antigénique ou site antigénique. L'anticorps correspondant présente sur sa surface une structure complémentaire, appelée site anticorps ou site de combinaison. On sait également qu'un antigène contient en général plusieurs déterminants, qui peuvent être de structure différente, si bien qu'un antigène unique peut donner naissance à plusieurs anticorps de spécificité différente. On peut ainsi expliquer l'existence de réactions croisées ou de précipitations partielles entre antigènes de structures voisines par rapport à un même anticorps.

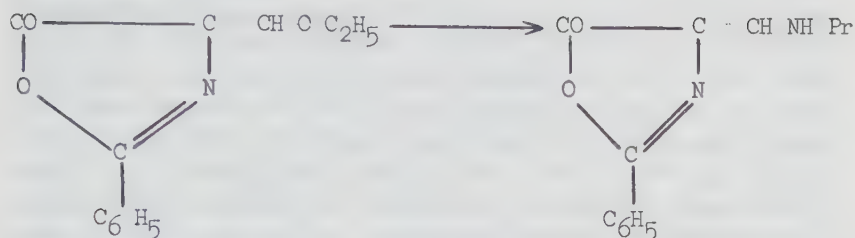
La spécificité antigénique a fait l'objet de très nombreuses études s'appuyant sur l'utilisation d'antigènes artificiels (42). Ces derniers permettent de déterminer les structures qui, sur l'antigène, conditionnent la spécificité de réaction : ceci grâce à l'utilisation ou à la préparation d'antigènes de formules chimiques voisines. C'est à Landsteiner et à son Ecole (49-55) que l'on doit une somme considérable de travaux sur ce sujet. Ces auteurs ont choisi un certain nombre de corps simples peu différents les uns des autres ou possédant en commun le facteur à étudier : acide aminé - acides ortho, meta ou para-benzoïques - acides isomères fumarique-maléique - acides tartriques etc... (43, 52, 67). Ces produits n'étant pas antigéniques par eux-mêmes ils doivent être fixés à des protéines, sérum total ou mieux globulines.

Différentes fonctions chimiques des acides aminés constitutifs des protéines ont pu être utilisées dans ce but, tels

- les groupes thiols (SH) libres,
- les groupes aminés libres ($-NH_2$) de la lysine qui ont été utilisés en faisant agir sur ces protéines notamment les dérivés halogénés du dinitro-2-4-benzène (17, 19) ou du trinitro-1-3-5-benzène (groupe picryle). Le fluoro-dinitro-2-4 benzène réagit avec certains des $-NH_2$ libres d'une protéine à froid ou à la température ordinaire. Une substance chimique particulièrement intéressante est la phenyl-2 éthoxy-méthylène 4-oxazoline 5 : injectée par voie intra-péritonéale au lapin, elle donne des taux appréciables d'anticorps. Elle se combine dans l'organisme aux protéines de l'animal, qu'elle rend ainsi étrangères ; il s'en suit la production d'un taux élevé d'anticorps contre l'haptène artificiel (22).

phényl-2-éthoxy

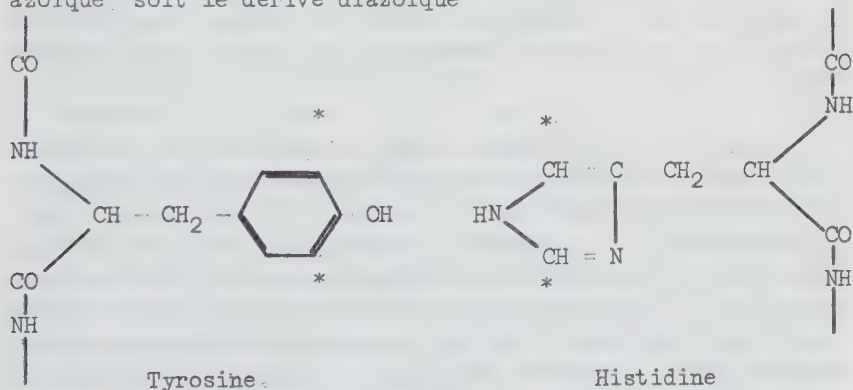
méthylène 4 oxazoline 5



Cette réaction prend naissance directement dans l'organisme, mais si elle existe pour d'autres corps, ces derniers produisent rarement un taux d'anticorps appréciable.

Le mode de préparation le plus utilisé par Landsteiner et par de nombreux auteurs ensuite, a été la réaction de diazotation et copulation (51). La copulation se fait essentiellement avec les restes tyrosine et à un moindre degré, avec les restes histidine.

Il peut se former dans chaque cas, soit le dérivé mono-azoïque, soit le dérivé diazoïque



Cette réaction permet d'introduire dans la molécule de protéine les substituants les plus variés; à condition d'avoir à faire à un dérivé substitué d'une amine aromatique. L'azoprotéine joue le rôle d'antigène tandis que le produit copulé se comporte comme un haptène, ce dernier ne peut à lui seul engendrer la formation d'anticorps, mais il est capable de prendre la place de l'antigène dans les réactions spécifiques de

mise en évidence des anticorps formés : précipitation, agglutination, etc... On est alors en présence d'haptènes précipitants. Landsteiner a pu, au moyen des antigènes artificiels mettre en évidence la présence d'haptènes non précipitants. Ce sont des substances chimiques simples, dérivées de l'antigène complet ou de l'haptène précipitant, capables de se combiner avec l'anticorps homologue et d'inhiber ainsi la réaction entre l'anticorps et un antigène complet ou un haptène précipitant. Ces substances ne sont jamais immunogènes par elles-mêmes et sont dites haptènes simples ou haptènes inhibiteurs; on les rencontre dans de nombreuses azoprotéines dont les déterminants artificiels sont donc des haptènes inhibiteurs.

L'utilisation des azoprotéines a permis à Landsteiner d'étudier l'influence d'un certain nombre de substituants sur la spécificité de l'haptène préparé artificiellement. Il a pu ainsi montrer notamment que les substituants neutres, sur un noyau aromatique, quelle que soit leur position, donnent des anticorps dont la spécificité est peu marquée (par exemple $\text{Cl} - \text{CH}_3 - \text{NO}_2$) (55). Par contre, la présence de 2 ou 3 substituants NO_2 sur le noyau benzénique, donne des antigènes à spécificité étroite. Les déterminants acides correspondant à l'acide p. amino-benzoïque, à l'acide p. amino-arsonique (atoxyl) et à l'acide p. amino-sulfonique, ont une activité encore plus marquée (49, 55). Les acides o.m. et p. amino-benzoïque par exemple ne donnent pas de réactions de précipitations croisées (51).

Landsteiner a également étudié les effets de l'allongement de la chaîne carbonée, en fixant à la protéine, des acides possédant une chaîne carbonée, plus ou moins longue (acide p. amino-oxanilique, succinanilique, adipanilique, etc...). De même des isomères optiques peuvent donner naissance à des anticorps distincts : l'orientation des substituants dans l'espace est donc importante aussi bien que la nature de ces derniers. C'est le cas pour les dérivés isomères de l'acide tartrique étudiés par Landsteiner (52). La technique des azoprotéines offre donc de grandes possibilités. C'est cette méthode que nous avons utilisée avec un dérivé de la colchicine que nous avons dû transformer chimiquement de façon à le rendre diazotable et copulable. Notre but a été ensuite de mettre en évidence les anticorps formés par d'autres réactions que celle de précipitation classique et d'étudier *in vitro* et *in vivo* la protection éventuelle par ces anticorps contre l'haptène considéré.

L'étude tant expérimentale que clinique de l'action de la colchicine et de ses dérivés est particulièrement intéressante bien qu'ayant donné naissance à de très nombreux travaux les mécanismes d'action en profondeur de ces produits ne sont, en effet, pas encore totalement élucidés. Pourtant, une meilleure connaissance de ces mécanismes semble essentielle pour la compréhension des phénomènes de croissance normale et surtout anormale, dans le cas des cellules malignes notamment. De plus, il est d'un intérêt primordial d'étudier l'activité de ces produits sur différents matériels cellulaires. La nature de l'effecteur est, en effet, un facteur fondamental qui peut influencer grandement les résultats. Ces recherches dans la série des colchicinaïques nous ont donc paru particulièrement intéressantes, à la suite des travaux déjà effectués par plusieurs auteurs dans ce domaine.

C'est en 1934 que Dustin (15) publia, dans le cadre général de ses recherches sur les poisons caryoclasiques, son "Etude de l'action de la colchicine sur le sarcome type Crocker, de la souris". Par la suite, il y eut de nombreux travaux sur la valeur anticancéreuse de la colchicine puis de ses dérivés.

Rappelons que c'est à la suite de la mise en évidence de l'analogie de certains des effets de la colchicine avec ceux des radiations ionisantes donnant naissance à des "lésions radiomimétiques" que l'on fut amené à utiliser cet alcaloïde dans le traitement expérimental des cancers. Sa caractéristique est de provoquer une action antimitotique d'ailleurs variable selon les doses. Les différents types d'actions antimitotiques ont été très étudiés sur la cellule végétale (Deysson 13 et 13b). Dans le cas de la colchicine et également pour la plupart de ses dérivés, après une action mitodépressive à faibles concentrations, on observe pour des doses convenables l'action mitoclasique caractéristique, correspondant à une inhibition du fonctionnement fusorial ou du cloisonnement cellulaire (13-14, 88). Celle-ci consiste en un blocage des mitoses (statmokinèses) avec absence de formation de fibres fusoriales et non-séparation des chromosomes accolés au niveau de la plaque équatoriale. Enfin, pour des concentrations élevées, survient une action mitostatique, aboutissant à la disparition de toute mitose. On pourrait donc penser qu'avec des doses convenables de colchicine, il serait possible de léser de façon élective les cellules tumorales. Malheureusement, comme l'ont montré les travaux de Truhaut et coll. (83, 84, 37) "en raison de la grande toxicité

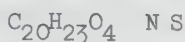
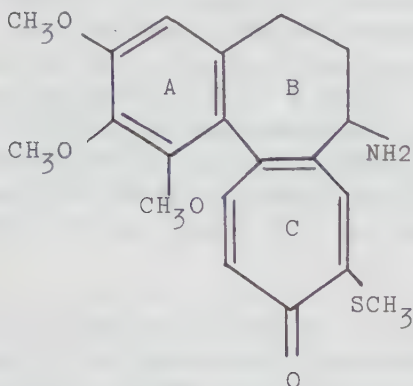
de l'alcaloïde, les doses efficaces risquent d'entraîner des effets nocifs graves, ce qui a considérablement réduit les espoirs fondés sur l'utilisation du produit en chimiothérapie anticancéreuse" (88). Même l'association thérapeutique expérimentale de la colchicine et de la roentgenthérapie étudiée par Huguenin, Truhaut et coll. (36) n'a pas permis d'améliorer de façon notable la tolérance au traitement ni d'augmenter suffisamment la marge thérapeutique efficace.

Ce sont donc les chimistes et les pharmacologues qui se sont attachés à mettre au point des dérivés de la colchicine, ayant à activité égale, une toxicité très atténuée. Ce fut le mérite, entre autres, de Lettré (60) et de Leiter et coll. (56). Plusieurs composés voisins de la colchicine ont été particulièrement étudiés tant in vitro qu'en expérimentation clinique par Truhaut et coll. et Huguenin, Truhaut et coll. Il s'agit tout d'abord de la Démécolcine ou substance F. de Santavy et Reichstein (75) qui s'est montrée nettement moins toxique que la colchicine. Elle a donné parfois certains résultats encourageants, mais ceux-ci ont été, dans de nombreux cas, insuffisants (84). De même, le colchicoside isolé des semences du *Colchicum autumnale*, s'il est moins toxique, possède également une activité mitoclasique très diminuée en thérapeutique humaine.

Un autre dérivé de la colchicine avait, vers 1950, retenu l'attention de divers auteurs américains (Goldberg, Downing, Fleischman) : la désacétylcolchicine. Lettré (1952) avait également montré que ce dérivé était le plus actif parmi les 26 produits étudiés par lui, à la fois sur les tumeurs ascitogènes du rat et en cultures de fibroblastes de poulets. En 1955, Lenti, Tartarolo et coll. ont étudié par la méthode de cultures dites "en goutte pendante" l'activité de ce produit sur les fibroblastes d'embryons de poulets et confirmé les résultats trouvés par Lettré. L'amélioration apportée n'était cependant pas suffisante.

La N-désacétylthiocolchicine semble, à l'heure actuelle, le produit le plus intéressant de ces dérivés. Elle a été synthétisée par Velluz et Muller (92) à partir de la thiocolchicine, elle-même obtenue également par ces auteurs par transformation de la colchicine (93). La substitution du soufre à l'oxygène au niveau de la fonction méthoxyle du cycle C, confère à la structure une meilleure stabilité à l'égard des acides

et facilite l'accès par hydrolyse chlorhydrique à l'amine libre correspondante qui est précisément la N-désacétylthiocolchicine.



P.M. 373

410 pour le chlorhydrate.

N-désacétylthiocolchicine (*)

L'expérimentation animale de ce produit a été conduite par Jequier et coll. (40,9) qui ont étudié sa toxicité par détermination de la dose létale 50% par voie intrapéritonéale chez la souris, et également son activité antimitotique sur la moëlle du rat, en déterminant la dose antimitotique 100 (D.A.M. 100), c'est-à-dire la dose nécessaire pour "bloquer" en mitose 100 cellules pour 1 000 éléments figurés de la moëlle durat. L'activité antimitotique est ainsi environ 10 à 12 fois moindre que celle de la colchicine; par contre, sa toxicité est 100 à 150 fois moins élevée. Le coefficient thérapeutique de la N-désacétylthiocolchicine devrait donc être amélioré de 10 à 12 fois.

Il faut rapprocher ces résultats de ceux obtenus par Truhaut et Deysson (86) sur cultures cellulaires végétales, sur les méristèmes radiculaires d'*Allium Cepa* L. Cette étude a montré que la N-désacétylthiocolchicine possédait des propriétés mitoclasiques tout à fait semblables à celles de la colchicine, avec une activité légèrement supérieure. La concentration-seuil d'action stathmokinétique totale qui est de $2,5 \cdot 10^{-7}$ M pour la colchicine est, en effet, un peu inférieure à $1,5 \cdot 10^{-7}$ M pour la N-désacétylthiocolchicine.

(*) Cette formule tient compte des dernières conclusions de Muller et Veiluz sur l'emplacement du carbonyle dans la structure de la colchicine (65).

L'action de la N-désacétylthiocolchicine sur les éléments figurés du sang a été également étudiée par Truhaut et coll. sur des rats soumis à des injections intrapéritonéales du produit pendant 20 jours, en effectuant périodiquement des numérations globulaires (88). Le taux des hématies ne subit pratiquement pas de variations, tandis que celui des globules blancs diminue progressivement. Cette diminution porte surtout sur les polynucléaires neutrophiles. Dès que l'administration du produit est interrompue, le taux des leucocytes remonte immédiatement pour s'abaisser à nouveau avec la reprise des injections. Ces constatations ont été retrouvées par ces auteurs en clinique humaine.

La N-désacétylthiocolchicine, bien que de toxicité atténuée par rapport aux autres dérivés colchiciniques, est d'une utilisation thérapeutique délicate. Huguenin, Truhaut et Saracino ont particulièrement étudié l'action de ce produit du point de vue clinique (38, 88, 89). La sensibilité individuelle s'est montrée assez variable et si l'on n'observe pas d'atteintes graves hépatiques ou rénales, les troubles digestifs et l'apparition de douleurs extrêmement vives, notamment au niveau des lésions néoplasiques malignes ne sont pas rares et doivent inciter à la prudence. La meilleure voie d'administration semble être la voie intraveineuse sous surveillance de la formule sanguine. L'indication majeure en est le traitement des leucémies myéloïdes vis-à-vis desquelles son efficacité peut encore se manifester alors que les agents physiques n'agissent plus. La N-désacétylthiocolchicine s'est également montrée efficace dans le traitement des tumeurs d'origine épithéliale. Son association avec la radiothérapie permet même, dans certains cas, des résultats très favorables.

Plus récemment, TRUHAUT et PAOLETTI (90) ont publié leurs essais à propos d'un certain nombre de dérivés de la colchicine sur deux tumeurs expérimentales greffées : l'adénocarcinome ascitique d'Ehrlich chez la souris et le carcinome de Walker chez le rat. De ces six produits présentant une action mitoclasique nette sur les cellules végétales (85) aucun ne semble, d'après les résultats sur les tumeurs animales, susceptible d'utilisation en clinique humaine. La démécolcine et surtout la désacétylthiocolchicine semblent être les dérivés de la colchicine les plus valables que nous possédions actuellement.

Pour cette raison et pour toutes celles que nous venons d'exposer, c'est à ce produit que nous avons eu recours pour effectuer nos recherches immuno-chimiques sur la formation d'anticorps anti-azoglobuline puis sur la protection par ces anticorps contre l'haptène correspondant.

De plus, la N-désacétylthiocolchicine possédait un NH_2 susceptible, pensions-nous, d'être diazotable donc transformable en azoglobuline. L'expérience devait cependant montrer que cette transformation ne pouvait s'effectuer directement.

*

*

*

Les étapes successives que nous avons dû suivre sont les suivantes :

- 1 - Choix du produit à étudier : la N-désacétylthiocolchicine
- 2 - Obtention d'un produit susceptible d'être antigénique pour l'animal.

Nous envisagerons successivement :

a) *les transformations chimiques* pour obtenir un produit diazotable et copulable aux protéines. Nous avons dû effectuer plusieurs tentatives pour utiliser finalement la technique suivante : fixation d'un pont intermédiaire para-amino benzène sulfonyl.

b) *l'isolement de la fraction gamma-globulinique du sérum* nous avons choisi le mode opératoire décrit par Deutsch (12).

c) *diazotation et copulation* des deux réactifs ainsi obtenus.

d) nous indiquerons ensuite la composition et les concentrations exactes des antigènes utilisés dans les expériences ultérieures

- antigène pour immunisation des animaux,

- antigène pour la mise en évidence des anticorps formés.

III - IMMUNISATION DES ANIMAUX

- Choix de l'animal : en général le lapin, nous avons pratiqué quelques expériences sur le cobaye, mais ceux-ci n'ont pas résisté aux injections.

- Technique d'immunisation.

- Description des différentes séries d'essais pratiqués : incidents et résultats.

IV - MISE EN EVIDENCE DES ANTICORPS FORMES

La nature de l'antigène utilisé, sa faible solubilité en milieux aqueux, ne permettent pas l'utilisation des réactions classiques de précipitation. On ne peut, en effet, préparer qu'une suspension aqueuse du produit; la partie globulinique de ce dernier est soluble en milieu légèrement alcalin, mais insuffisamment pour entraîner la mise en solution de la fraction chimique copulée.

Nous avons pensé tout d'abord utiliser les réactions immunologiques en gélose :

- technique de diffusion d'Ouchterlony (68)

- immuno-électrophorèse selon Grabar et Williams (26, 27)

Nous espérons résoudre les difficultés de solubilisation et de diffusion de l'antigène en incorporant ce dernier à la gélose du milieu, après l'avoir dissout dans un solvant approprié. Malgré de nombreuses tentatives et selon plusieurs modes opératoires, nous n'avons pu soit éviter la floculation de l'antigène au cours de la période de révélation, soit obtenir une migration satisfaisante dans le milieu gélosé.

Nous avons donc recherché d'autres techniques ne présentant pas les mêmes exigences quant à la nature de l'antigène et capables de mettre en évidence la formation d'anticorps spécifiques chez les lapins immunisés. La réaction de déviation du complément nous a donné toute satisfaction et nous a permis de montrer la présence chez les lapins expérimentés d'anticorps spécifiques du produit injecté.

Ayant la preuve de l'existence d'anticorps spécifiques, nous avons voulu voir si ces anticorps étaient capables d'assurer une protection quelconque contre la toxicité de départ du produit chimique.

V - ETUDE D'UN EFFET DE PROTECTION EVENTUELLE

Peut-on par immunisation à l'aide du produit copulé aux globulines, protéger l'animal ou des cellules en culture contre la toxicité ou les altérations dues à ce produit ?

1) Nous avons tout d'abord procédé à une étude in vivo chez la souris qui comprend les points suivants :

Détermination des toxicités de la N désacétylthiocolchicine et de son dérivé, par la méthode de la DL 50, sur des lots de souris saines ;

- Immunisation d'un lot de souris avec le produit diazoté et copulé aux globulines ;

- Détermination de la DL 50 sur ce lot de souris "Immunisées".

2) Essais de protection in vitro en cultures cellulaires d'embryons de poulets

Nous avons mis au point la technique de cultures cellulaires d'embryon de poulet après trypsination et sur milieu à l'hydrolysate de caséine (58) en l'adaptant à des expériences de toxicité et de protection qui exigent pour chaque série un grand nombre d'essais. Pour cela, nous avons opéré la culture en flacons à lamelles : chaque série d'expériences comprenant de nombreux témoins et au moins cinq flacons pour chaque essai, exige une cinquantaine de flacons. L'utilisation de flacons à lamelles facilite grandement des recherches de cette ampleur : ils permettent en effet une coloration directe des cellules dans ces flacons et ensuite le montage des lamelles au baume du Canada sur des lames qui sont examinées au microscope et conservées aussi longtemps que nécessaire : on peut ainsi effectuer les comparaisons indispensables entre les différentes lames d'une même série et même de séries réalisées à plusieurs semaines d'intervalle.

De plus, l'examen de cultures cellulaires en couche unicellulaire, permet une étude fine de la toxicité d'un produit et d'observer aussi bien les modifications protoplasmiques que nucléaires de chaque cellule. Cette technique apporte donc un progrès très notable comparée aux méthodes de toxicité aigüe.

L'adaptation de cette technique aux essais de protection en présence de sérum de lapin immunisé nous a amené également à résoudre une difficulté imprévue, liée à l'action propre du sérum de lapin sur les cultures cellulaires d'embryon de poulet. Ayant évité cet écueil nous avons pu étudier la protection cellulaire par les sérums de lapins immuns, contre le dérivé para-amino-benzène-sulfonyl de la désacétylthiocolchicine. Ceci a nécessité une étude préalable, par la même technique, de la toxicité de ce produit; nous en avons profité pour effectuer une détermination comparée de l'activité de ce dernier produit et de la désacétylthiocolchicine sur les cultures cellulaires d'embryons de poulets.

Le plan général de notre travail sera donc le suivant :

I - PARTIE CHIMIQUE

Choix du produit à étudier et transformation de celui-ci en un dérivé antigénique pour l'animal.

II - IMMUNISATION DES ANIMAUX

III - MISE EN EVIDENCE DES ANTICORPS FORMES

- 1) Réactions immunologiques en milieu gélosé
- 2) Réaction de déviation du complément

IV - ESSAIS DE PROTECTION CONTRE L'ACTIVITE DU PRODUIT ETUDIE

- In vivo chez la souris :

Détermination de la DL 50 - pour la N-désacétylthiocolchicine

pour son dérivé p.amino-benzène-sulfonyl.

Immunisation des souris et DL 50 sur ces souris.

- In vitro en cultures cellulaires d'embryon de poulet :

Essais de cytotoxicité - de la N-désacétylthiocolchicine de son dérivé.

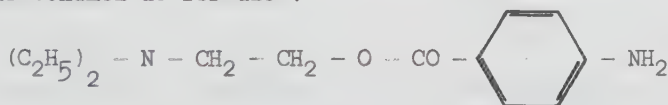
Essais de protection grâce aux sérums de lapins immuns.

RESULTATS ET CONCLUSIONS

I - PARTIE CHIMIQUE EN VUE DE L'OBTENTION D'UN COMPOSE ANTIGENIQUE

A - CHOIX DU PRODUIT DE DEPART

Avant d'appliquer la technique des azoprotéines au produit que nous avons choisi d'étudier, il nous a semblé intéressant de vérifier les résultats obtenus par cette méthode, telle que nous pensions la pratiquer, en utilisant un produit chimique simple facilement diazotable et copulable aux globulines, et dont la mise en évidence des anticorps formés pouvait se révéler aisée. Lors de ces premières expériences, nous avons utilisé la NOVOCAINE, ou PROCAINE; chlorhydrate de p. amino benzyl diéthylamino-éthanol de formule .



Nous avons suivi la technique qui sera développée à propos de la N-désacétylthiocolchicine

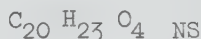
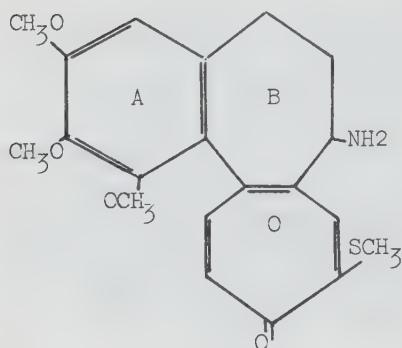
- diazotation et copulation à la fraction gamma globulinaire de sérums de lapins ;
- immunisation des lapins avec l'azoprotéine obtenue ;
- mise en évidence des anticorps formés à l'aide de la méthode de diffusion en gélose d'Ouchterlony (68).

Ces essais préalables nous ont permis de vérifier le mode opératoire suivi et de noter la formation d'anticorps spécifiques antinovocaïne chez l'animal. On observe pour des dilutions convenables d'antigène et d'anticorps, un arc de précipitation spécifique à la rencontre de la novocaïne et du sérum de lapin anticorps correspondant, qui n'existe pas avec les globulines de lapin non copulées, ni avec des produits chimiques voisins, acide para-amino-benzoïque par exemple.

Le choix du produit destiné aux expériences proprement dites, s'inscrivant comme nous l'avons décrit précédemment, dans le cadre des recherches sur les dérivés colchicinaux, a été dicté, du point de vue chimique, par la présence indispensable dans la formule de celui-ci d'une fonction aminée libre.

Nous avons finalement choisi pour toutes ces raisons, la N-désacétylthiocolchicine, dont l'étude de la toxicité cellulaire et la suppression éventuelle de celle-ci par les anticorps formés nous a paru particulièrement intéressante et offrir les perspectives les plus vastes.

Présentation du produit : N-désacétylthiocolchicine



P.M. 373

410 pour le chlorhydrate

Utilisée sous forme de chlorhydrate, soluble dans l'eau, c'est une poudre jaune, cristalline.

La base est insoluble dans l'eau, soluble dans l'alcool et la pyridine. Elle a un point de fusion de 204 - 206°.

Ce produit a été synthétisé par VELLUZ et Muller (92, 93) à partir de la thiocolchicine, préparée elle-même à partir de la colchicine. Ces auteurs décrivent ainsi l'obtention de ce nouveau produit "La substitution du soufre à l'oxygène, au niveau de la fonction méthoxyle du cycle C, confère à la structure une meilleure stabilité à l'égard des acides. On accède ainsi directement après hydrolyse chlorhydrique à la N désacétylthiocolchicine".

MULLER et VELLUZ ont publié plus récemment (65) une mise au point sur la position exacte des substituants du noyau C.

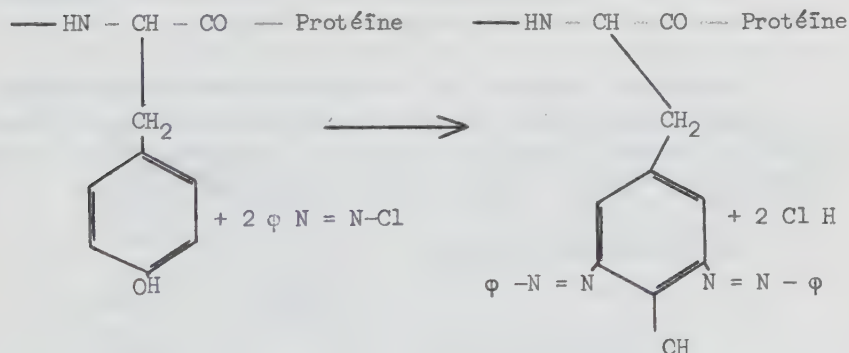
La formule reproduite ci-dessus tient compte de ces dernières conclusions.

Notre but était donc, grâce à la tyrosine présente en quantité notable dans les protéines sériques, de fixer la N-désacétylthiocolchicine sur ces dernières. La fonction phénolique de la tyrosine permet en effet de combiner ces protéines au chlorure de diazonium du produit étudié. On obtient alors l'azoprotéine cherchée (32).

La diazotation est effectuée par Landsteiner et coll. selon la technique classique, par action de nitrite de sodium et d'acide chlorhydrique, à basse température. Dans un second temps en neutralisant le milieu et en opérant en solutions aqueuses à basse température on copule généralement très facilement le chlorure de diazonium à la fraction gamma globulinique du sérum (51).

Il suffit de calculer les proportions des deux réactifs à mettre en oeuvre, sachant que 1 gramme de gamma globulines contient environ 67 mg de tyrosine et qu'une molécule de cet A.A. peut fixer deux molécules de sel de diazonium.

Le schéma général de la réaction est donc le suivant .



Nous avons effectué cette réaction avec la N-désacétylthiocolchicine en faisant réagir .

- 410 mg du produit sous forme de chlorhydrate
- 25 ml d'une solution de globuline à 2%.

Nous n'avons cependant pu obtenir la formation d'un dérivé azoïque coloré, comme on pouvait l'espérer, malgré des tentatives répétées.

La raison semble en être la nature du groupement NH^2 de la N-désacétylthiocolchicine, qui n'est pas fixé à un noyau aromatique benzénique et n'est pas à même, dans ces conditions, de donner naissance au diazo-dérivé correspondant.

Cependant la stabilité plus grande de la molécule après remplacement de l'oxygène par le soufre dans le groupement méthoxyle du cycle C, les exemples de transformations effectuées sur cette fonction amine, en amides et N-sides notamment, nous ont permis d'envisager la fixation d'un pont apportant un NH^2 benzénique actif, sans que l'activité cytostatique du produit soit profondément modifiée ce que nous avons d'ailleurs vérifié.

- Préparation d'un produit susceptible d'être antigénique pour l'animal.

- Fixation d'un chaînon à fonction amine aromatique :

Recherchant des réactions d'exécution facile, notre but principal n'étant pas chimique, nous avons, semble-t-il plusieurs possibilités :

- action du p. amino-benzaldéhyde : mais nous ne disposons que d'un produit technique polymérisé et impur.

- action du chlorure de l'acide p. nitro-benzofique, mais il faut envisager ensuite la réduction de la fonction nitrée en fonction aminée. Même en utilisant des réducteurs doux, nous n'étions pas certains de conserver la molécule intacte.

Nous avons alors utilisé :

- le chlorure de l'acide para-acétamido benzofique :



Ce produit est préparé à partir de l'acide p. amino-benzofique.

On protège la fonction aminée par acétylation et il suffit après réaction du chlorure d'acide de libérer celle-ci par hydrolyse.

Préparation du chlorure de l'acide p acétamido benzoïque

Les étapes successives sont les suivantes

amidification de l'acide p. amino benzoïque,

passage au chlorure d'acide,

libération de la fonction aminée par hydrolyse

a) Amidification de l'acide p. amino benzoïque .

Après un essai avec le chlorure d'acétyle dans l'éther anhydre, nous avons utilisé l'anhydride acétique.

technique

Dissolution d'une molécule d'acide p. amino-benzoïque dans 300 ml d'eau chaude,

Ajouter sous agitation et goutte à goutte : anhydride acétique 2 molécules

	PM	Prise d'essai
P AB	137	13 7
$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{O}$	102	20 4
Eau chaude		300 ml

Nous disposons d'un récipient pyrex dans lequel sont ménagées trois ouvertures

un orifice central permettant l'agitation continue,

deux orifices latéraux l'un comme sortie d'air et l'autre pour recevoir une ampoule à décantation qui permet de faire des affusions progressives d'anhydride acétique dans le milieu de réaction.

Cristallisation du produit acétylé obtenu :



Transvaser dans un ballon et compléter à environ 300 ml d'eau, chauffer à l'ébullition avec un réfrigérant à reflux 20 à 30 minutes.

Filtrer très chaud et laisser cristalliser par refroidissement.

Si il y a un résidu insoluble, recommencer l'opération avec 300 ml d'eau environ, distiller à nouveau à reflux et refaire cristalliser. On obtient ainsi un produit cristallisé que l'on dessèche convenablement et qui fond à 252° .

b) Passage au chlorure d'acide

Nous avons utilisé la méthode de Mc MASTER et HMANN au chlorure de thionyle (61).

Ce produit est un liquide jaunâtre émettant des vapeurs très désagréables et à manipuler avec précautions. Nous avons utilisé un produit pur que nous avons redistillé avant usage.

Redistillation du chlorure de thionyle

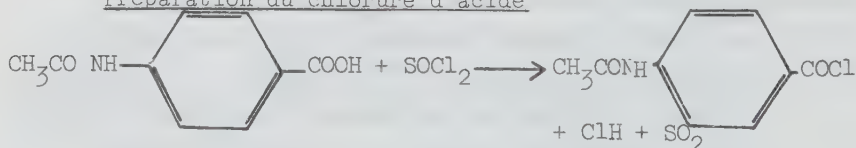
Petit appareil à distiller comprenant un ballon, avec la téralement une colonne réfrigérante surmontée d'un ajutage pour thermomètre ; le tout est relié à un ballon récepteur permettant de travailler sous vide.

point d'ébullition : $78^{\circ}8 - 79^{\circ}$.

On opère sous vide en chauffant légèrement et on refroidit sous eau froide le ballon recevant le produit distillé

Le produit ainsi obtenu : le chlorure de thionyle est presque incolore.

Préparation du chlorure d'acide



Chauffer 4 heures à reflux

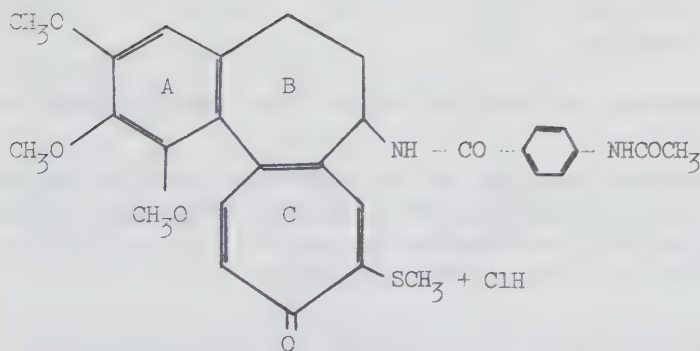
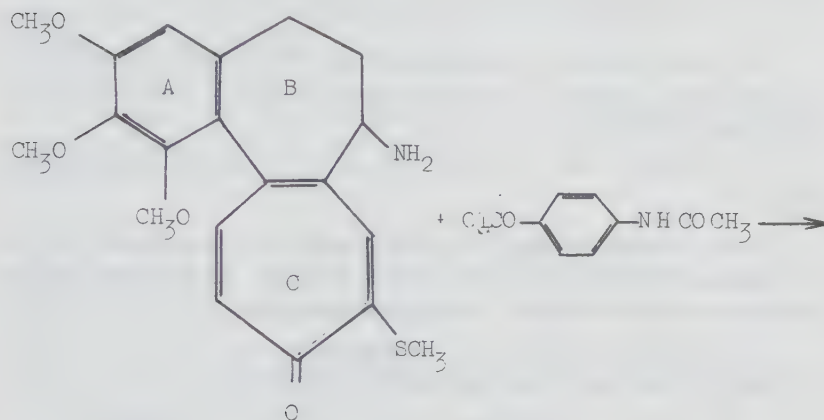
acide p acétylaminobenzoïque 1 partie
chlorure de thionyle rectifié en excès 4 parties.

Isolement du produit obtenu :

Le produit n'est pas soluble immédiatement dans le chlorure de thionyle mais après une demi heure environ de chauffage le mélange devient jaune brun et liquide

On chauffe 4 heures à reflux et à légère ébullition

L'excès de chlorure de thionyle est chassé et l'on peut isoler ensuite un liquide incolore d'odeur légèrement piquante. Son point d'ébullition est de 108° à la pression ordinaire. Il passe à une température inférieure si on opère sous vide avec l'appareil décrit précédemment.



Il suffit de faire agir ce chlorure d'acide sur la N-désacétylthiocolchicine base et de libérer la fonction aminée par désacétylation pour obtenir le produit diazotable et copulable aux globulines. Les conditions opératoires sont identiques à celles que nous avons suivies avec le chlorure de l'acide p. acétamido benzène sulfonyl : nous allons les décrire avec ce produit puisque c'est le dérivé que nous avons utilisé dans la plupart des expériences ultérieures.

... Fixation d'un chaînon à fonction amine aromatique par action du chlorure de l'acide p. acétamido benzène sulfonyl.



produit chimiquement pur délivré dans le commerce.

1) Neutralisation du chlorhydrate de N-désacétylthiocolchicine pour libérer la fonction amine. On obtient la précipitation de la base.

- Le produit est mis en solution aqueuse, suffisamment diluée.

- On neutralise par addition lente à l'aide de Na OH N/20 de façon à éviter une précipitation brutale de produit collant aux parois et difficile à récupérer ensuite.

- On laisse se décanter en vérifiant le pH et que le surnageant ne précipite plus par addition de soude.

- On filtre sur büchner et fait sécher soigneusement.

Le produit obtenu est jaune clair, d'aspect cristallin - point de fusion 204 - 206°.

2) Action du chlorure de l'acide p. acétamido-benzène-sulfonyl :

Le précipité bien sec est dissous dans la pyridine anhydre (réactif conservé sur pastilles de potasse) ainsi que le chlorure d'acide (82). Les dissolutions sont faciles et on utilise les quantités de pyridine juste nécessaires.

Les deux solutions sont mélangées et la réaction s'effectue au bain-marie bouillant pendant 15 minutes.

On verse ensuite sur de la glace pilée de façon à refroidir complètement et acidifie avec une solution aqueuse de Cl H N : le produit formé précipite.

Ce précipité est mis à décanter, filtré sur büchner, lavé à l'eau, essoré, séché et recristallisé dans la pyridine aqueuse. Le produit obtenu est jaune vif, d'aspect cristallin, P.F. voisin de 315°

3) Désacétylation :

Le composé acétylé est dissous dans le minimum du mélange alcool chaud additionné d'acide chlorhydrique (100 ml d'alcool - 5 ml ClH concentré pour 2 g de désacétylthiocolchicine).

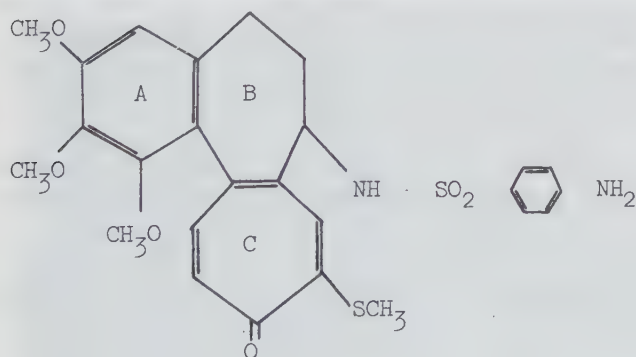
On chauffe le mélange à reflux pendant 4 heures (82). L'alcool est ensuite distillé sous vide en évitant une trop forte élévation de température.

Le résidu est additionné d'eau puis de carbonate acide de sodium par petites fractions pour précipiter la base de son chlorhydrate.

On laisse reposer pour obtenir une précipitation complète, filtre sur büchner, lave à l'eau. On recristallise dans un minimum d'alcool - (le produit est très soluble dans ce solvant).

Le produit obtenu est amorphe, de teinte jaune verdâtre à point de fusion 165 - 170 °C.

Il est prêt à être diazoté et copulé aux globulines.



Nous avons voulu vérifier que ces différentes transformations n'avaient pas altéré les noyaux et que nous avions toutes chances d'être en possession du dérivé cherché. Pour cela, nous avons pu comparer les spectres infra-rouges du R 261 (produit pur, commercialisé) et du produit obtenu (3,30).

Ces spectres infra-rouges ont été déterminés sur un spectrographe UNICAM SP 200 à prismes de NaCl, en solutions compensées dans le chlorure de méthylène à 5 % (épaisseur de la cellule 0,1 mm) (*).

(*) Nous tenons à remercier M.J. PANOUSE, Maître de Conférences agrégé pour l'aide qu'il nous a apportée dans l'interprétation de ces spectres

Les conclusions sont les suivantes; dans le spectre du sulfamide, on note :

(a) : des bandes situées pratiquement aux mêmes endroits que celles de la N-désacétylthiocolchicine enregistrée dans les mêmes conditions : il y a une grande similitude dans la région des empreintes digitales et une absorption complexe de même type vers $1540 - 1560 \text{ cm}^{-1}$ (vibration de valence $\text{C}=\text{O}$ et $\text{C}=\text{C}$ du groupement tropolone soufré).

Conclusion : Il n'y a vraisemblablement pas d'altération du noyau.

(b) : à 1155 et 1320 cm^{-1} , deux bandes intenses et caractéristiques du groupement $\text{N}-\text{SO}_2$ - (sulfamide).

(c) : apparition d'une bande supplémentaire vers 1620 cm^{-1} et augmentation de la bande existante à 1600 cm^{-1} , présente dans la N-désacétylthiocolchicine. Ces modifications sont dues, selon toute vraisemblance, au groupe aniliné supplémentaire (vibrations de valence $\text{C}=\text{C}$ et vibrations de déformation - NH de NH_2).

(d) : apparition d'une bande supplémentaire à 3200 cm^{-1} attribuée à la fonction amine supplémentaire. On notera à ce sujet que, comme dans le cas de la N-désacétylthiocolchicine, le groupement NH_2 n'entraîne pas l'apparition d'un doublet, mais seulement d'une bande de vibration de valence unique.

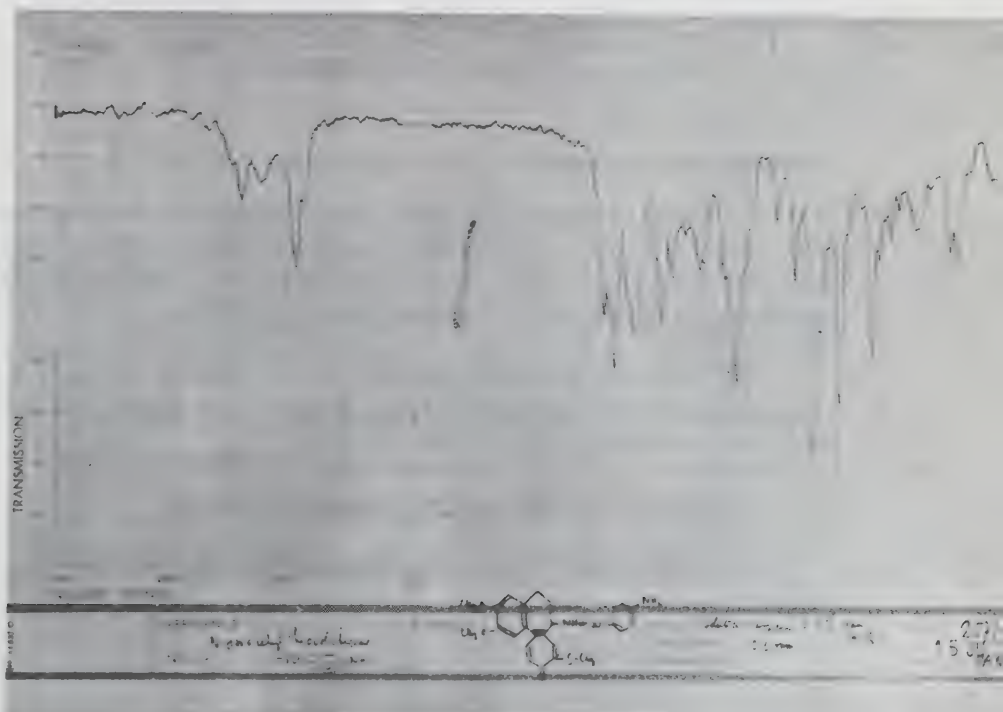
(e) : une bande à 840 cm^{-1} dans le composé sulfamidé; celle-ci doit être due au noyau benzénique paradisubstitué (2 C-H adjacents).

Le spectre infra-rouge est donc compatible avec la structure proposée.

-Préparation des globulines

Nous avons utilisé soit des globulines humaines, soit des globulines de lapin. Il faut disposer de sérums en quantité suffisante.

Dans le cas du lapin, l'animal est saigné sous anesthésie à l'éther. On dénude la carotide, héparine légèrement et peut injecter en fin d'expérience une petite quantité d'eau physiologique dans la veine saphène interne pour obtenir un volume de sérum supérieur.



La technique utilisée est celle de Deutsch (12) dérivée de celle de COHN à l'alcool. Il faut opérer à froid pour éviter la dénaturation des globulines.

Le sérum est dilué dans 3 fois son volume d'eau

On ajuste à pH 7,6 - 7,8 s'il y a lieu et refroidit à 0° C jusqu'à apparition de cristaux.

On prépare d'un autre côté, un volume identique d'alcool à 50° C refroidi à - 10°, - 20° C. On s'aide généralement d'un mélange d'alcool et carboglace.

Cet alcool est ajouté lentement, sans agitation brutale. La température doit être maintenue à - 6° C environ, mais on ne doit pas observer l'apparition de cristaux à la fin de l'opération. On laisse le précipité se décanter à cette température. Il contient les gamma globulines avec certaines autres globulines, notamment des beta.

30 minutes après, on centrifuge à - 5°, - 7° C, température qui est facilement obtenue avec la centrifugeuse réfrigérée.

Le précipité est lyophilisé, conservé sous vide à froid. Il sert à préparer des solutions extemporanées à 2%.

- Précautions à prendre

- Il faut toujours refroidir au préalable les solutions alcooliques (- 10°, - 20° C) avant l'addition aux protéines. Ces dernières sont elles-mêmes refroidies près de leur point de congélation. On maintient la température à - 6° C.

- La quantité d'alcool ajoutée, une agitation efficace et le maintien d'une température basse durant l'addition d'alcool sont des facteurs déterminants.

- Utilisation d'une centrifugeuse réfrigérée.

- On opère sur le sérum pour éviter la présence de fibrinogène.

Il est, d'autre part, souvent préférable d'étudier les réactions immunologiques avec les gamma globulines plutôt que d'utiliser le sérum complet (intervention de facteurs tels que complément et lipides).

Cette technique nous a semblé préférable du point de vue exécution et résultats à celle utilisant l'acide acétique dilué que nous avons pratiquée auparavant.

- Réaction de diazotation - Copulation

Nous utilisons des globulines préparées comme précédemment et diluées à 2% dans le sérum physiologique.

Le produit à diazoter est obtenu comme il est écrit plus haut. En ce qui concerne les quantités de réactifs à mettre en jeu, rappelons :

- qu'une molécule de protéine fixe 2 molécules de produit,
- qu'il faut donc compter : - 0,528 g du produit à diazoter,
- 27 ml d'une solution de globulines à 2%.

- Mode opératoire

Diazotation :

Le produit à diazoter est solubilisé par additions successives de petites quantités dans l'alcool chlorhydrique (CIH N).

1 millimolécule du produit à diazoter :

0,528 g dans : - alcool	25 ml
- CIH N	3 ml

On ajoute à 0°, lentement :

10 ml NO₂NA à 2,5 %

Attendre 3/4 d'heure en maintenant la température vers 0°C.

Copulation :

Le diazo-dérivé est ajouté à une solution préalablement refroidie (0°) contenant 540 mg de globulines de lapin, soit :

- 27 ml d'une solution à 2%

- 13 ml de CO_3Na_2 N/10

Vérifier que le pH est alcalin.

Laisser 30 minutes à 0°C.

Purification et lavages :

On ajoute CLH N/10 progressivement jusqu'à acidité légère au rouge congo (virage du rouge au bleu à pH 3).

Le précipité est centrifugé à froid et lavé plusieurs fois par centrifugation avec de l'eau physiologique légèrement acide.

On met en suspension dans l'eau physiologique en réglant le pH au voisinage de la neutralité ou très légèrement alcalin.

Le produit copulé obtenu est de teinte chamois-marron clair.

Il est prêt à être diazoté et copulé aux globulines.

- Préparation des solutions antigéniques

- Antigènes pour immunisation :

Nous avons utilisé une solution à 0,5 % contenant donc 5 mg/ml préparée à partir du précipité d'azoprotéine précédemment purifié et lavé ; solution à 0,5 % dans l'eau physiologique au voisinage de la neutralité.

Il ne s'agit pas d'une solution vraie, mais d'une suspension homogène si l'on a soin d'agiter avant l'emploi

Conservation : Nous conservons le précipité d'azoprotéine à - 20° et ne préparons les solutions qu'au fur et à mesure du besoin.

• Antigènes pour réaction antigène-anticorps

L'azoprotéine est préparée comme précédemment, mais nous avons utilisé :

- soit une solution de concentration double, à 1% dans l'eau physiologique,
- soit une solution à 1% dans le propylène glycol, dans le but d'obtenir la meilleure solubilisation et la meilleure diffusion possible en gélose.
- ou dans un mélange à parties égales de propylène glycol et d'eau physiologique.

II - IMMUNISATION DES ANIMAUX DE LABORATOIRE

La production d'anticorps chez un animal de laboratoire est variable selon les espèces et même selon les individus d'une même espèce ; il n'est pas rare sur un lot de 6 lapins, de n'obtenir des taux d'anticorps décelables que chez quatre d'entre eux. Dans le but d'obtenir de meilleurs résultats, on adjoint à l'antigène, surtout s'il s'agit d'un produit peu immunogénique, des substances diverses désignées sous le nom de substances adjuvantes (21). Il en existe de deux types principaux :

- les adjuvants constitués par des sels minéraux insolubles ou donnant un précipité avec la préparation antigénique : ils permettent de renforcer le pouvoir immunogène des antigènes protéiques solubles : ce sont notamment l'alun de potassium et l'hydrate d'alumine.

- les adjuvants huileux, simples, sont utilisés de façon à réaliser une émulsion d'eau dans l'huile : le type en est l'adjuvant incomplet de Freund. Cependant, l'effet de ces adjuvants huileux est considérablement renforcé par l'addition de corps microbiens tués de mycobactéries ; ce qui est réalisé dans l'adjuvant complet de Freund (20).

Nous avons utilisé ce produit pour vacciner certains lots de lapins, notamment par la voie intra-musculaire. En voici la formule :

Adjuvants de Freund (10).

1) - *Type incomplet* (sans mycobactérie), 2 formules :

- a) 3 parties d'huile de vaseline fluide,
1 partie de lanoline anhydre,
4 parties de tampon phosphate pH 7.

b) 4 parties de n-hexadecane

1 partie de mono-oléate de glycerol (Myverol, distillation products, INc.)

10 parties de tampon phosphate.

2) - *Type complet* (avec mycobactérie) :

Ajouter les mycobactéries (bacilles tuberculeux vivants tués par la chaleur, *Mycobacterium butyricum* ou *M. Smegmatis*) pour obtenir une concentration finale de 10 mg par ml d'émulsion eau dans l'huile. On peut utiliser la même concentration finale pour chaque antigène. Les bacilles et l'antigène devront être mis en suspension dans la phase aqueuse avant d'être émulsionnés.

3) - *Mise en émulsion* :

L'émulsifiant (c'est-à-dire le mono-oléate de glycérol) est dissous dans l'huile, et l'huile est étendue à la surface de l'eau. Les émulsions eau dans l'huile sont obtenues par mélange des deux phases par agitation vigoureuse à l'aide d'une seringue et d'une aiguille de grand diamètre, d'une vibreur, d'un mélangeur puissant ou de tout autre instrument de ce genre. L'appareil est abaissé dans le mélange de façon à provoquer l'émulsion de la surface jusqu'au fond. On peut essayer la stabilité d'une émulsion eau dans l'huile en abandonnant une goutte de celle-ci sur de l'eau froide : la goutte doit rester intacte.

Animaux utilisés :

- lapins : un lot de 6 lapins par série d'expérience.

- cobayes : nous avons effectué quelques essais avec des lots de 8 cobayes en injectant des quantités en fonction du poids des animaux. Mais les cobayes ont généralement très mal supporté ces injections présentant soit des chocs à la seconde ou troisième injection, soit succombant en cours d'immunisation.

Technique d'immunisation :

Nous avons utilisé les différentes voies d'injection parentérale, de façon à obtenir les meilleurs résultats.

Le schéma général a été le suivant .

- trois injections tous les deux jours pendant 6 jours,
- repos une semaine,
- nouvelle série d'injections suivie de repos,
- trois à quatre séries d'injections et prélèvement du sérum une semaine après la dernière injection. On peut faire une prise de sang à la veine de l'oreille, en cours d'immunisation, dans le but de déceler la présence des anticorps et poursuivre les injections si cette épreuve se montre négative. De toutes façons, après 8 à 10 semaines, les lapins sont saignés et les sérums recueillis pour effectuer les réactions immunologiques.

Première série :

Selon le schéma général, un lot de 6 lapins reçoit à chaque injection :

- | | |
|--------------------------------------|------------------------------|
| - 2 ml de solution pour immunisation | } par voie
intraveineuse. |
| - 0,5 ml d'adjuvant de Freund (20) | |

Il faut faire des injections lentes et strictement dans la veine, pour éviter les chocs et l'action nécrosante du produit; sans quoi toute injection ultérieure devient impossible.

Inconvénients observés :

- mort d'un lapin par choc à la seconde injection,
- mort d'un lapin à la cinquième injection,
- mort d'un autre lapin avant la fin des expériences par amaigrissement intense, état cachectique.

Nous avons donc obtenu 3 sérums.

Seconde série :

Un lot de 6 lapins a reçu une injection par semaine, par voie intrapéritonéale de 10 ml de solution; un seul lapin a succombé avant la fin des expériences.

Troisième série :

Effectuée comme la première par voie intraveineuse, mais sans adjoindre d'adjuvant.

Nous avons obtenu quatre sérums.

Quatrième série

Chaque série hebdomadaire d'injections comprenait :

- le premier jour injection intra-péritonéale de 10 ml de solution,

- le troisième jour, injection intra-musculaire de 2 ml de solution additionnée de 0,5 ml d'adjuvant.

- le cinquième jour, injection sous-cutanée de 2 ml de produit.

Ces expériences ont été poursuivies pendant 10 semaines et nous ont donné cinq sérums.

Cinquième série

Effectuée comme la précédente :

- avec un lot de 6 lapins,

- et un lot de 8 cobayes, en diminuant les doses en conséquence.

Aucun des cobayes n'a survécu à plus de trois séries d'injections.

Sixième série

Effectuée sur un lot de 6 lapins.

Les précédentes expériences avaient été réalisées avec un antigène composé du produit copulé à des globulines de lapin, ce qui pensions-nous éviterait l'interférence d'anticorps anti-globulines, ne révélant que les anticorps spécifiques de l'azo-globuline.

En raison du taux très faible d'anticorps généralement observé, nous avons refait une série d'immunisation en utilisant cette fois le produit copulé à des globulines humaines, ce qui pourrait stimuler la formation des anticorps spécifiques. En utilisant, pour les réactions immunologiques, un antigène à base de globulines de lapin, on éviterait de même l'intervention des anticorps antiglobulines humaines, en laissant paraître uniquement les anticorps antiazo-proteïnes.

Chaque lot de six lapins a été traité comme suit :

- première semaine : trois injections intra-veineuses de 2 ml de l'azoprotéine "humaine".

- repos d'une semaine ;

- seconde et troisième séries d'injections intra-musculaires de 2 ml du produit additionné de 0,5 ml d'adjuvant.

- Un essai partiel n'ayant pas permis de mettre en évidence la formation des anticorps, nous avons poursuivi l'immunisation par deux injections intra-péritonéales de 10 ml d'antigène à une semaine d'intervalle.

Les animaux ont été saignés la semaine suivant la dernière injection, nous donnant six sérums qui ont été également soumis aux réactions immunologiques décrites dans le chapitre suivant.

Le mode opératoire qui a donné les meilleurs résultats est donc le suivant :

- utilisation d'azoprotéines constituées par la dérivé para-amino-benzène-sulfonyl de la N-désacétylthiocolchicine, copulé à des globulines humaines,

- première semaine : trois injections IV de 2 ml d'antigène

- repos d'une semaine,

seconde et troisième séries d'injections intra-musculaires de 2 ml de produit additionné de 0,5 ml d'adjuvant complet de Freund.

- Enfin, deux injections intra-péritonéales de 10 ml d'antigène à une semaine d'intervalle.

Les animaux sont saignés la semaine suivant la dernière injection.

III - REACTIONS IMMUNOLOGIQUES DESTINEES A METTRE EN EVIDENCE LES ANTICORPS SPECIFIQUES FORMES

Le choix des réactions immunologiques, a été dicté principalement par les caractères particuliers de l'antigène employé : l'azoglobuline n'est que très faiblement soluble en milieu aqueux ou en eau physiologique et on ne peut obtenir qu'une suspension aqueuse de ce produit ; la partie globulinique de ce dernier est soluble en milieu légèrement alcalin, mais insuffisamment pour entraîner la mise en solution de la fraction chimique copulée. Le dérivé para-amino benzène sulfonyl de la désacétylthiocolchicine n'est soluble qu'en milieu chlorhydrique concentré, dans l'alcool, le propylène glycol ou dans certaines limites dans un mélange de propylène glycol et d'eau physiologique.

Il était donc exclu d'utiliser les réactions de précipitation classiques, telles que Landsteiner les a décrites. Il nous a paru plus intéressant d'essayer d'adapter les techniques modernes de diffusion en gélose au problème que nous avons ainsi à résoudre (8, 29).

Dans un second temps nous avons eu recours à une méthode qui utilise de préférence des suspensions antigéniques : la réaction de déviation du complément selon une technique dérivée de celle de Kolmer (46).

1) - Immuno-électrophorèse en gélose :

Cette technique qui combine les avantages de la séparation électrophorétique de zone et le caractère de spécificité de la réaction de précipitation antigène-anticorps, permet une identification spécifique des fractions antigéniques par pré-

cipitation avec l'immun-sérum correspondant. Elle doit donc nous permettre de mettre en évidence les anticorps spécifiques formés dans le sérum des lapins immunisés (27, 31, 76, 77).

Cependant la réaction antigène-anticorps étant soumise au phénomène de zone, nous avons au préalable déterminé le rapport optimum entre l'antigène et l'immun-sérum correspondant à une précipitation maximale par simple diffusion en gélose selon la technique d'Ouchterlony (68). En effet, l'addition à une quantité fixe d'anticorps, de quantités décroissantes d'antigène, donne lieu à la formation d'un précipité dont l'importance passe par un maximum correspondant le plus souvent à une neutralisation complète de l'antigène; la réaction immuno-électrophorétique réalisée en tenant compte de ces conditions a d'autant plus de valeur.

a) — technique d'Ouchterlony :

Les antigènes et les anticorps étant contenus dans des trous creusés dans le gel, diffusent l'un vers l'autre et forment un précipité linéaire à l'endroit où l'antigène et l'anticorps se trouvent en quantités convenables.

Réactif : formule de la gélose :

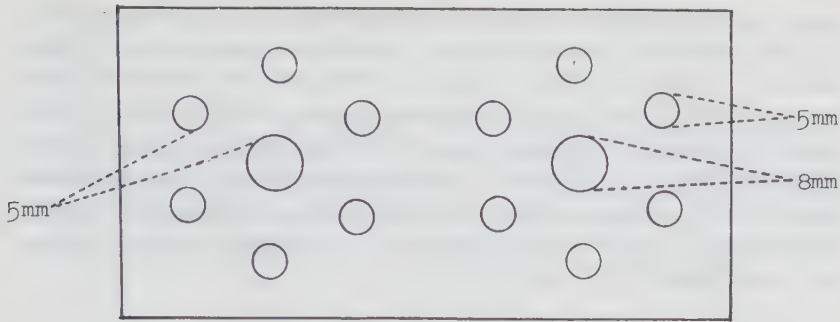
— gélose spéciale purifiée	1	g
— ClNa	0,85	g
— eau distillée	100	ml

Ajouter 11 gouttes de solution aqueuse de merseptyl à 10%

Technique :

La gélose est portée à l'ébullition quelques minutes, jusqu'à dissolution complète et coulée après refroidissement sur des plaques de verre (de 12 cm x 6 cm) à raison d'une épaisseur de 3 à 4 mm. Pour éviter le débordement de la gélose, on peut soit entourer les plaques d'agitateurs de verre, soit déposer ces plaques dans le fond d'un bac en plastique, disposé sur une surface bien horizontale.

On pratique alors, dans la gélose refroidie et solidifiée un trou central destiné à recevoir l'immun-sérum pur, au 1/5 ou au 1/10, et six trous disposés régulièrement autour, pour les dilutions croissantes d'antigène généralement pur, 1/2, 1/4, 1/6, 1/8, et 1/10ème.



Trou central : immun-sérum pur, 1/5 ou 1/10ème

Trous périphériques : dilutions d'antigène

par exemple : pur, 1/2, 1/4, 1/6,
1/8, 1/10ème.

Les plaques sont disposées sur des bouchons de caoutchouc dans un bac contenant de l'eau merthiolatée et recouvert d'une plaque de verre pour éviter la dessiccation de la gélose. Le bac est laissé à la température ordinaire jusqu'à révélation

b) -- *Immuno-électrophorèse proprement dite (26)* --

Celle-ci comprend donc deux temps :

-- l'électrophorèse en gélose .

Réactifs :

- Tampon véronal :

- véronal sodique	10,76 g
-- véronal	1,66
-- eau distillée	Q.S.P. 1000 ml

-- Gélose tamponnée :

-- gélose d'excellente qualité	1 g
· eau distillée	50 g
· tampon véronal	50 g

La gélose est préparée comme précédemment en portant à l'ébullition quelques minutes et coulée avec les mêmes précau-

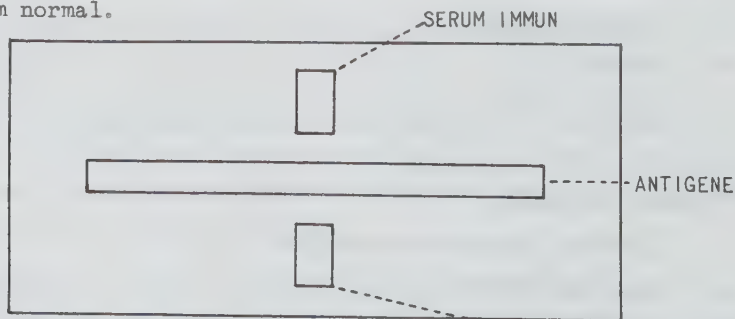
tions sur une plaque de verre (d'environ 12×8 cm) en ayant soin de conserver des connexions en gélose tamponnée qui établiront le contact avec les cuves contenant le tampon et dans lesquelles baignent les électrodes. Sous l'effet d'un champ électrique, dont le gradient de potentiel est de 5 à 6 v/cm, les différentes protéines du sérum vont migrer et se séparer de part et d'autre d'ailleurs du réservoir de départ, du fait des courants d'électro-endosmose qui entraînent les particules les plus lentes vers la cathode.

- La phase de migration étant achevée, on creuse dans le gel une longue gouttière qui reçoit l'immun-sérum. Les plaques sont conservées dans des bacs, dans les mêmes conditions que les Ouchterlony. Pendant ce temps, les protéines vont diffuser au sein de la gélose, radialement pour les antigènes séparés par électrophorèse et parallèlement à la gouttière pour les anticorps que celle-ci renferme. La rencontre de l'antigène et de l'anticorps correspondant produit des précipités spécifiques qui prennent la forme d'arcs de précipitation, visibles grâce à la transparence de la gélose.

Nous avons utilisé la technique d'immuno-électrophorèse selon deux modalités (96) :

1) Migration électrophorétique d'un sérum normal d'une part et du sérum immun d'autre part, déposés chacun dans un réservoir creusé dans la gélose.

Ensuite dépôt dans la gouttière centrale de l'antigène incorporé à la gélose. On observe un arc de précipitation spécifique entre l'antigène et le sérum immun, absent dans le cas du sérum normal.

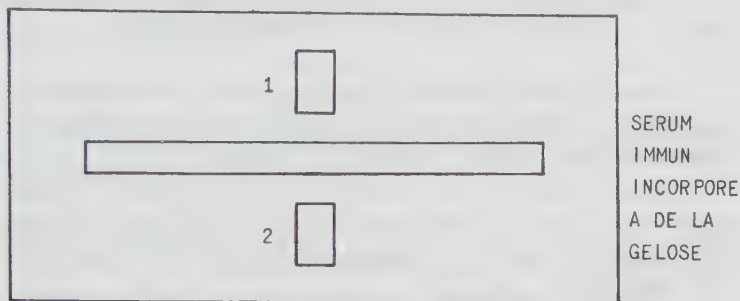


2) Migration dans chacun des réservoirs :

- d'une part d'un mélange sérum normal + antigène,
- d'autre part d'un mélange sérum immun + antigène

On révèle par le sérum immun déposé dans la gouttière centrale.

Après révélation, on doit observer un arc de précipitation avec le mélange sérum normal + antigène, absent dans le cas du mélange sérum immun antigène. Il y a eu dans ce cas neutralisation antigène-anticorps par mélange préalable.



1 Mélange du sérum normal et de l'antigène.

2 " " " immun " " "

- Modifications apportées à cette technique :

En vue de solubiliser l'antigène ou de permettre la diffusion de ce dernier en gélose.

- Dissolution de l'antigène dans différents solvants :

- en eau physiologique en milieu légèrement alcalin,
- dans le propylène glycol,
- dans du sérum de lapin normal,
- dans un mélange à parties égales d'eau physiologique et de propylène glycol.

Dans chaque cas, les dilutions ont été soit distribuées directement, soit après incorporation à la gélose du milieu dans la proportion d'un tiers de produit pour deux tiers de gélose.

- Technique d'immuno-électrophorèse directe (95) :

Dans cette technique, on pratique une électrophorèse en gélose de l'antigène et aussitôt après, le sérum immun est répandu à la surface de la gélose ; il diffuse, se combine spécifiquement à l'antigène et donne des taches correspondant à la

surface totale de la fraction antigénique correspondante, et non plus des arcs ou des lignes de précipitation. Ces taches ont la taille, la forme et la position de la fraction antigénique à la fin de sa migration électrophorétique. Elles peuvent, après lavage convenable, être colorées par une technique de coloration des protéines en gélose (10). On opère par comparaison avec une électrophorèse en gélose de l'antigène seul: les taches sont d'une intensité beaucoup plus importante lorsqu'il y a eu précipitation antigène-anticorps.

Nous avons également appliqué cette méthode de la façon suivante: migration sur la même plaque de gélose d'un sérum immun déposé en deux endroits différents: l'un est coloré directement, l'autre est recouvert d'antigène (4 heures); la plaque est lavée, colorée et comparée à la précédente. Il est important de mesurer la quantité de sérum immun déposée dans les deux cas.

- Incorporation à la gélose de substances polyhydroxylées capables de favoriser la diffusion de l'antigène et d'éviter sa précipitation au cours de la révélation.

Si la gélose est habituellement préparée en milieu tamponné, certains auteurs ont utilisé d'autres réactifs: eau distillée, azide de sodium, acide amino-acétique, carbonate de sodium, carbonate acide de sodium, etc... Heitefuss et collaborateurs (34) ont utilisé des substances polyhydroxylées telles que glucose, saccharose, glycérol à des concentrations pouvant atteindre 25%. Nous avons essayé d'adjoindre à la gélose du propylène glycol dans les proportions suivantes:

- gélose 1 g
- tampon véronal 40 ml
- propylène glycol 20 ml
- eau distillée 40 ml

Après migration des sérums, l'antigène est déposé, incorporé dans les proportions de un tiers à cette même gélose.

Résultats :

Malgré de très nombreux essais, à l'aide de ces différentes techniques et avec de multiples sérums, nous n'avons pu obtenir une diffusion convenable de l'antigène. Nous nous

attachons d'ailleurs encore actuellement à résoudre ce problème qui nous semble d'un intérêt général, chaque fois que l'on est en présence d'un antigène de poids moléculaire assez élevé et peu soluble en milieu aqueux.

Les réactions de déviation du complément, que nous avons pratiquées par ailleurs sont réalisées de préférence avec des suspensions antigéniques : elles s'appliquent donc tout particulièrement au cas présent.

2) Mise en évidence des anticorps formés grâce à la réaction de déviation du complément.

Nous avons appliqué le principe de la réaction de déviation du complément à la mise en évidence d'anticorps spécifiques dans le sérum des lapins immunisés. La technique utilisée découle de la méthode quantitative de Kolmer qui a déjà trouvé de nombreuses applications en dehors du diagnostic sérologique de la syphilis, notamment dans le cas des maladies virales (6, 46-48).

Réactifs utilisés :

· Eau physiologique destinée à effectuer toutes les dilutions, les lavages des hématies. C'est le soluté isotonique de chlorure de sodium à 9 g %, fraîchement préparé.

· Hématies : hématies de mouton, provenant de sang de mouton recueilli aseptiquement aux abattoirs et défibriné. Les hématies sont séparées par centrifugation.

Ces hématies sont lavées, au moment du besoin, à l'eau physiologique par au moins trois centrifugations successives : le liquide surnageant le culot d'hématies est rejeté et remplacé par du liquide neuf jusqu'à ce que le surnageant ne soit plus coloré. Le culot d'hématies fourni par la dernière centrifugation est dilué au volume final en eau physiologique ; ici au 1/50ème du culot d'hématies.

· Sérum hémolytique anti-mouton : c'est un sérum de lapin anti-hématies de mouton, obtenu par injections répétées au lapin d'hématies de mouton lavées, stériles. Ce sérum hémolytique est constitué par la fraction globulinique contenant l'anticorps anti-hématies et se présente sous forme d'une solution concen-

trée, glycerinée, de sensibilisatrice hémolytique qui est employée très diluée dans les réactions.

Le sérum hémolytique est titré dans les conditions de la réaction originale de Bordet-Wassermann, ce qui permet d'exprimer son efficacité en unités hémolytiques. Le sérum hémolytique dont nous disposons titre 10 000 unités/ml.

Il est utilisé au cours de la réaction à la concentration de 3 U/0,1 ml, soit 30 unités/ml, c'est-à-dire une dilution au 1/333ème soit 1 ml/332 ou 0,1 ml/33 ou avec une approximation convenable 0,025 ml soit 11 gouttes de sérum hémolytique (bouchon capillaire spécial) pour 8 ml d'eau physiologique.

- L'alexine ou complément :

Mélanges de sérums frais de cobaye, conservés sous forme lyophilisée et au réfrigérateur. Ce complément reconstitué au moment du besoin par addition d'eau distillée ou de liquide conservateur possède un titre voisin d'un lot à l'autre et qui se maintient quelque temps au réfrigérateur.

Le complément est titré, avant son utilisation dans la réaction proprement dite, en présence de l'antigène et avec le même mélange de globules sensibilisés.

- Les antigènes :

Ils sont au nombre de quatre :

Antigène 1

Le produit chimique dérivé de la N-désacétylthiocolchicine et préparé comme il a été dit précédemment; il a été mis en solution dans une partie de propylène glycol et dilué ensuite dans 4 parties d'eau physiologique de façon à obtenir une suspension antigénique au 1/50ème.

Antigène 2

Il est constitué par le produit précédent diazoté et copulé aux globulines humaines, tel qu'il a été utilisé pour les épreuves d'immunisation : c'est une suspension en eau physiologique au 1/50ème.

Antigène 3

Nous avons également utilisé un antigène voisin mais contenant des globulines de lapin, toujours en suspension au 1/50ème

Antigène 4

Enfin, antigène constitué par des globulines humaines, seules, en eau physiologique à 0,5 - 1 et 2 %.

Nous avons tenu compte du pouvoir anticomplémentaire de ces différents antigènes en opérant le titrage du complément en présence de la dose d'antigène introduite dans la réaction. Nous avons ensuite à l'aide d'un sérum positif (dans le cas de l'antigène 2) déterminé la dilution optimale d'antigène à utiliser : celle qui donne encore une inhibition de l'hémolyse avec la dilution maximale de ce sérum : l'antigène est ensuite utilisé à cette dilution.

— Sérums de lapins décomplémentés.

Technique

1 -- titrage du complément

Le complément dilué au 1/100ème est introduit en quantités croissantes dans une série de 12 tubes. Le temps de fixation est effectué pendant 1 heure à 37°, en présence d'antigène; on introduit alors les hématies sensibilisées et fait la lecture de la réaction après un séjour de 30 minutes à 37°. On note le premier tube où apparaît l'hémolyse totale et on utilise 2 unités de complément sous 0.20 ml.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Complément au 1/100è	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	-
Antigène	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	-
Eau physiologique	0,22	0,20	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-	0,40
Bain-marie à 37° -- 60 minutes.													
GR 2 % 0,10	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
SH 3 U 0,10													
Bain-marie à 37° -- 30 minutes.													
Titre pour 2 unités dans 0,2 ml	1/125	1,100	1/83	1/71	1/62	1/55	1/50	1/46	1/42	1/38	1/35	1/33	-

Les tubes correspondant à la réaction proprement dite sont les tubes 3 - 4 - 5 - 6.

L'introduction dans les tubes 1 - 2 d'un sérum de lapin normal permet de déceler une réaction faussement positive, non spécifique.

Les tubes 7 à 10 décèlent le pouvoir anticomplémentaire éventuel des sérums aux faibles dilutions.

Les tubes A B C sont une vérification du titrage du complément en présence de l'antigène. Ils permettent d'éviter un excès trop important de complément qui risquerait de négativer la réaction à tort.

Le tube D est un témoin des hématies sensibilisées.

Résultats :

La réaction s'est montrée négative avec les antigènes 1 et 4, c'est-à-dire :

- produit chimique seul
- globulines humaines.

Elle s'est montrée par contre positive, avec concordance de tous les témoins de réaction avec l'antigène n°2, constitué du produit chimique copulé aux globulines humaines, le produit même qui a été utilisé pour immuniser les lapins. La réaction est également positive, mais à des taux inférieurs avec l'antigène n°3.

Les taux de non hémolyse pour les trois sérums examinés sont de 1/40ème pour les sérums 1 et 4 et de 1/20ème pour le sérum 2. Dans le cas de l'azoglobuline de lapin, sur cinq sérums examinés trois ont donné des taux atteignant 1/10ème.

Les anticorps mis en évidence sont donc étroitement spécifiques du produit de départ, l'antigène ayant servi à l'immunisation des lapins ; et ils se montrent spécifiques de l'ensemble, c'est-à-dire du produit copulé aux globulines humaines ou aux globulines de lapins.

Nous avons pensé que le produit chimique seul, constituait une mauvaise suspension antigénique ne permettant pas une mise

en évidence directe des anticorps formés mais qu'elle serait suffisamment active pour inhiber la réaction précédemment positive avec l'antigène total.

Pour le vérifier, nous avons opéré une fixation préalable en mettant en contact :

- antigène n° 1 0,10 ml
- sérums immuns 0,10 ml
- (dilutions 1/2,5 - 1/5 - 1/10 - 1/20)
- contact pendant 1 nuit à + 4°.

Nous avons ensuite effectué la réaction comme précédemment en distribuant :

dans une première série de tubes : l'antigène n° 2 et les sérums immuns décomplémentés et dilués comme précédemment,

dans une seconde série de tubes, ce même antigène, mais en présence des sérums immuns préalablement absorbés comme il vient d'être dit.

Résultats

La réaction positive avec l'antigène complet s'est confirmée dans les conditions décrites précédemment.

Par contre, la réaction s'est trouvée négative, hémolyse totale, après contact des sérums avec le produit chimique seul. On peut donc interpréter cette réaction comme une fixation spécifique des anticorps par le premier antigène, produit chimique seul. Ces anticorps ne peuvent plus agir sur l'antigène complet, comme ils le font dans la réaction directe d'où la négativation de la réaction.

Le produit chimique non copulé joue donc, dans cette réaction le rôle d'haptène inhibiteur et occupe une partie du site anticorps qui n'est plus disponible pour l'antigène proprement dit, l'azoglobuline. Les anticorps ainsi formés chez l'animal ne peuvent être mis en évidence qu'en présence de l'antigène homologue complet. Ceci rejoint les travaux d'autres auteurs, Landsteiner notamment, qui ont permis de distinguer lors de l'immunisation par une azoprotéine $Pr_1 H_1$ (80) .

Des anticorps anti Pr_1 qui réagissent avec la protéine native, avec les globulines humaines dans notre cas. Ceci permet d'ailleurs d'éliminer ces anticorps par contact préalable.

Des anticorps anti H_1 , anti-haptène qui réagissent avec l'haptène combiné à n'importe quelles globulines, humaines, de lapin, etc...

- Enfin des anticorps qui réagissent uniquement avec l'antigène homologue : anticorps anti $Pr_1 H_1$. Ils sont incapables de réagir directement avec l'haptène incomplet ni avec les globulines seules, ni avec cet haptène combiné à d'autres globulines que celles qui ont servi à l'immunisation (globulines de lapin si l'on a utilisé des globulines humaines). Ces anticorps ont été dénommés anticorps "anti-liens" par ces auteurs, et il semble bien que nous ayons à faire à des anticorps de ce genre dans les expériences que nous avons décrites.

Cependant la réaction d'inhibition montre que ces anticorps sont étroitement spécifiques de la fraction chimique copulée.

IV - EFFET DE PROTECTION A L'AIDE DES ANTICORPS FORMES

1) Essai de protection in vivo chez la souris :

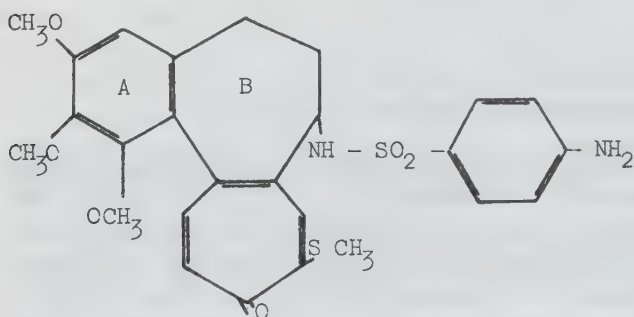
L'immunisation des lapins à l'aide du dérivé para-amino-benzène-sulfonyl de la N-désacétylthiocolchicine copulé à des globulines humaines, nous a donc permis de mettre en évidence dans le sérum de ces animaux, des anticorps du type "anticorps-liens", spécifiques de l'ensemble de l'azoprotéine injectée, le produit chimique seul jouant le rôle d'haptène inhibiteur.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de voir si l'immunisation de souris pouvait réaliser une protection efficace et notable contre la toxicité du produit non copulé. Notre but est donc, dans un premier temps de déterminer la DL 50 du produit transformé, non copulé et en opérant sur d'autres lots d'animaux, de vacciner ces derniers grâce à l'azoglobuline et enfin, de voir s'il y a eu effet de protection, c'est-à-dire une diminution significative de la toxicité de départ. Etant donné qu'il faut opérer sur un grand nombre d'animaux que l'on ne peut pas, d'un autre côté, injecter des doses considérables de ces produits, difficiles à se procurer et très onéreux, nous avons choisi la souris comme animal d'expérience : des animaux aussi semblables que possible provenant de la même livraison et de poids voisins. Nous avons d'autre part estimé intéressant d'effectuer la DL 50 du dérivé para-amino-benzène-sulfamide comparativement à celle de la N-désacétylthiocolchicine, détermination déjà effectuée pour ce dernier produit par d'autres auteurs (40, 41). Notons, cependant dès maintenant, qu'ayant utilisé une solution du dérivé transformé, dans l'eau physiologique et le propylène glycol à parties égales, nous avons opéré dans les mêmes conditions avec la désacétylthio-

colchicine Le propylène glycol pur à dose massive (50 ml/kg) ne s'étant pas montré totalement dénué de toxicité, il pourrait se faire que, dans ces conditions, on ne retrouve pas exactement les chiffres donnés par ces auteurs.

- Détermination de la DL 50 chez la souris pour les 3 produits étudiés

1 - Produit transformé, c'est-à-dire, dérivé para-aminobenzène-sulfamide de la N-désacétylthiocolchicine.



Produit utilisé :

Solution dans un mélange à parties égales de sérum physiologique et propylène glycol. Les solutions ont été préparées en tenant compte de la solubilité du produit et d'un volume à injecter ne dépassant pas 0,4 à 0,5 ml, pour plus de commodité et également pour éviter une influence trop grande de ce solvant particulier, tout en ayant une appréciation très correcte à l'aide de seringues au 1/100 de la dose à injecter en fonction du poids.

Voie d'injection :

Nous avons choisi la voie intra-péritonéale.

Matériel :

Nous disposons d'une balance monoplateau qui une fois tarée nous donne directement le poids de l'animal. Les souris sont attrapées par la peau entre les deux oreilles à l'aide d'une pince qui entre dans la tare à vide et évite ainsi plusieurs manipulations. Les souris sont suspendues grâce à la pince à un support type support à burette et l'on peut ainsi opérer avec le maximum de rapidité.

- Essai préliminaire :

Pour déterminer la zone à explorer ultérieurement de façon plus précise, nous injectons à quelques animaux (trois par dose) 100 mg/kg, 150 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg. Nous avons utilisé des solutions à 0,5-1 et 2 % pour être dans les conditions indiquées précédemment.

Le nombre de survivants a été relevé après environ 6 heures et 24 heures. Toutes les souris ont succombé à partir de 150 mg/kg et au-delà. Par contre, pour la dose inférieure, 100 mg/kg, il y avait encore un mort en 24 heures. Nous avons donc décidé que la zone intéressante à étudier était de 100 à 150 mg/kg, mais qu'il serait bon de diminuer légèrement les doses au-dessous de 100 mg/kg.

- Essai proprement dit :

Effectué sur un nombre plus important de souris, soit 10 souris par dose, de 70 à 150 mg/kg, de 10 en 10 mg.

La méthode de détermination graphique utilisée est celle de Miller et Tainter (91,64) :

On dispose d'un papier logarithme-probabilité sur lequel on porte en abscisse (échelle logarithmique) les doses, et en ordonnées (échelles probits) les pourcentages de mortalité.

Pour la détermination de la DL 50, on accorde une valeur plus grande aux points situés au voisinage du pourcentage 50 (probit = 5), qu'à ceux qui ont des ordonnées supérieures à 84 (probit = 6) ou inférieures à 16 (probit = 4).

La DL 50 est lue directement sur l'abscisse du point d'ordonnée 50.

Les résultats obtenus en 6 et 24 heures sont les suivants :

Doses en mg/kg	70	80	90	100	110	120	130	140	150
Nombre de morts en 24 h. max.	0	1	1	2	5	7	7	8	10

Récapitulation des résultats et calcul de la DL 50

mg/kg	morts	survivants	totaux cumulatifs		% décès
150	10	0	41	0	100
140	8	2	31	2	91
130	7	3	23	5	79
120	7	3	16	8	64
110	5	5	9	13	39
100	2	8	4	21	15
90	1	9	2	30	7
80	1	9	1	39	2
70	0	10	0	49	0

DL 50 du produit transformé à raison de 10 souris par dose.

Calcul de l'écart type (méthode de Miller et Tainter) (64)

$$E = \frac{2 S}{\sqrt{2N}}$$

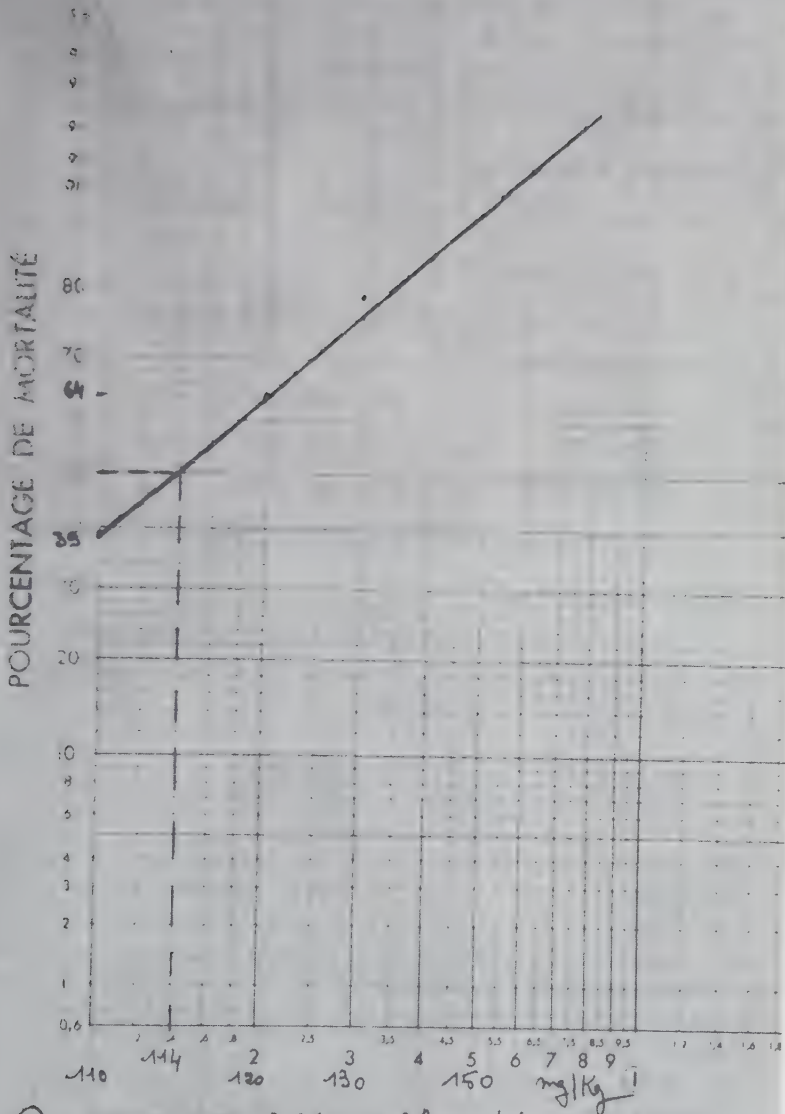
- 2 S est l'accroissement de dose nécessaire pour accroître la réponse de 2 probits. C'est la différence entre probits 4 et 6, soit 16 et 84% de mortalité. Dans le cas présent 132 - 100 mg/kg soit 32.

- N est le nombre total d'animaux dans les groupes qui ont donné des % de mortalité entre 3,5 et 6,5 probits, soit 6,7 et 93,3 % soit 60 animaux.

$$E = \frac{32}{\sqrt{120}} \approx 3$$

La DL 50 obtenue pour le dérivé p. amino-benzène-sulfamide de la désacétylthiocolchicine (voir graphique n°1) est donc de

114	+	3 mg/kg
-----	---	---------



①

JOUAN - PARIS

R261 sulfamide.

2 .. DETERMINATION DE LA DL 50 CHEZ LA SOURIS DANS LE CAS DE LA N DESACETYLTHIOLCHICINE

- Produit utilisé -

N-désacétylthiocolchicine en solution à parties égales dans le propylène glycol et le sérum physiologique, de façon à opérer dans des conditions identiques à celles du produit sulfamidé et à pouvoir comparer les chiffres obtenus.

- Technique d'injection -

par voie intrapéritonéale chez la souris.

- Essai préliminaire -

Il a été effectué sur trois souris pour chaque dose.

Dose injectée :

- 100 mg/kg : on n'a pas observé de mort,
- 150 mg/kg : une souris est morte en 48 h.
- 200 mg/kg : une souris est morte en 24 h.
- 250 mg/kg : les trois souris sont mortes en 24 h.

- Essais définitifs -

Les doses étudiées vont de 120 à 250 mg/kg, de 20 en 20 mg pour les faibles doses et de 10 en 10 dans la zone avoisinant la DL 50, de 200 à 250 mg/kg

Les expériences ont été effectuées sur un total de dix souris pour chaque dose.

Résultats :

Doses en mg/kg	120	140	160	180	200	210	220	230	240	250
Nombre de morts en 24 h. maxi. (pour 10 souris).	0	1	2	2	2	4	4	6	7	10

Dose mg/kg	morts	survivants	totaux cumulatifs		% décès
250	10	0	38	0	100
240	7	3	28	3	90
230	6	4	21	7	75
220	4	6	15	13	53
210	4	6	11	19	37
200	2	8	7	27	21
180	2	8	5	35	12
160	2	8	3	43	6
140	1	9	1	52	2
120	0	10	0	62	0

Calcul de l'écart type (méthode de Miller et Tainter)

$$E = \frac{2 S}{\sqrt{2 N}}$$

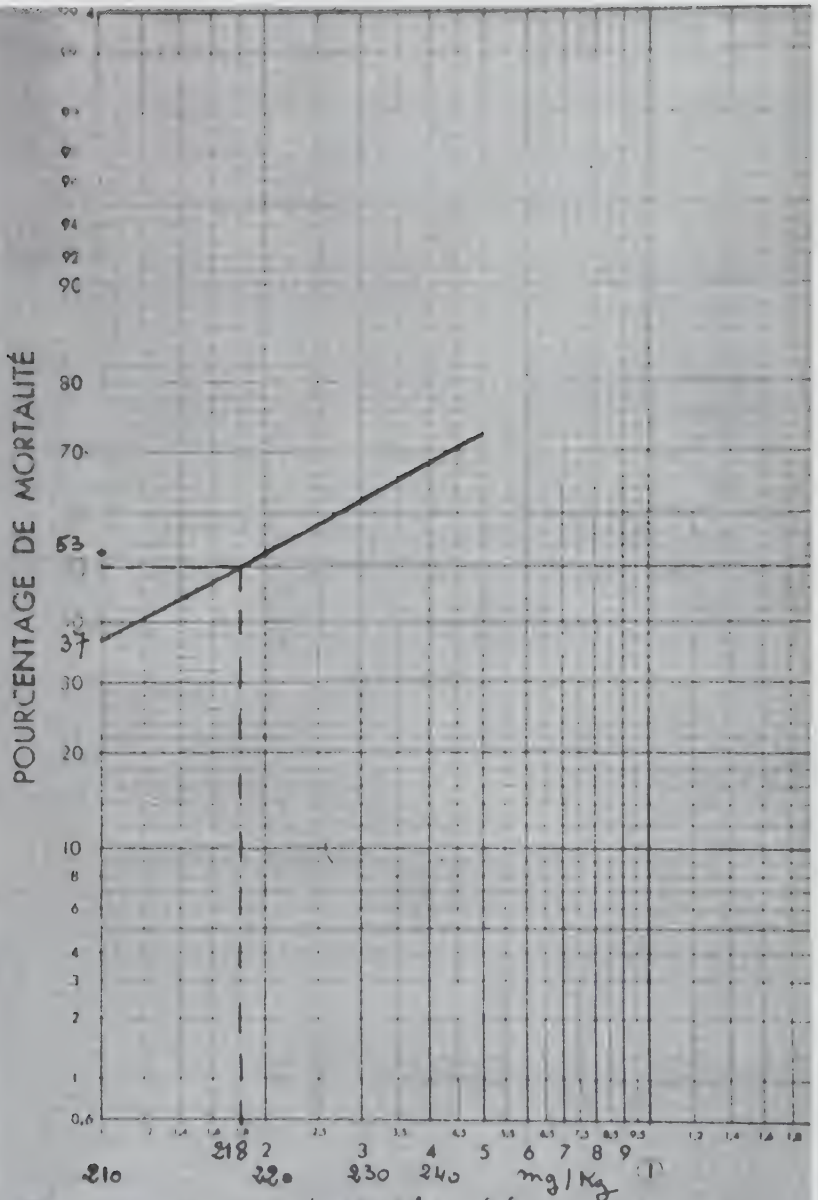
$$2 s = 235 - 186 = 49$$

$$N = 60$$

$$E = \frac{49}{\sqrt{120}} \text{ soit } 4,5$$

La DL 50 obtenue pour la N-désacétylthiocolchicine (voir graphique n° 2) est donc de :

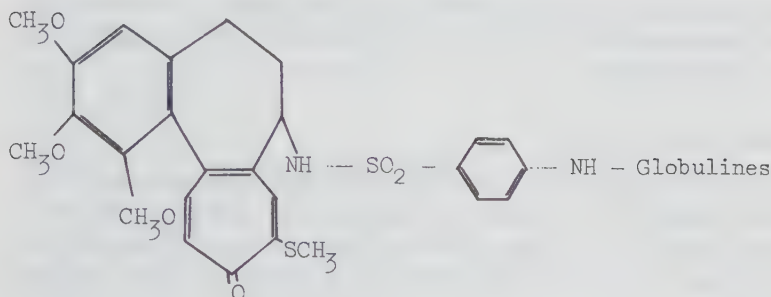
$218 \pm 4,5 \text{ mg/kg}$



(2)

JOUAN - PARIS N Désacetylthiocolchicine

3 . DETERMINATION DE LA DL 50 CHEZ LA SOURIS DANS LE CAS DE L'AZOGLOBULINE. -



Produit utilisé -

Nous avons eu recours à des suspensions d'azoprotéines "humaines" dans un mélange à parties égales de propylène glycol et d'eau physiologique. Ces suspensions étant sans effet toxique chez la souris, nous avons augmenté les doses jusqu'à 2, 3 et 4 g/kg.

Technique d'injection -

Voie intra-péritonéale chez la souris.

Essais -

Les doses injectées à des lots de dix souris par dose, ont atteint 2, 3 et 4 g/kg d'azoglobuline. Nous n'avons pu préparer des suspensions injectables plus concentrées.

Résultats -

Dans ces conditions, il n'y a eu aucune mort ni immédiate, ni retardée, chez les souris en expérience qui ont été conservées un mois.

Il faut remarquer que l'azoglobuline contient peu de produit chimique étant donné le rapport des poids moléculaires des globulines et de ce produit. Ceci peut donc facilement expliquer l'absence de toxicité aigüe.

Les épreuves de la DL 50 chez la souris avec ces trois produits montrent également une nette augmentation de la toxicité pour le dérivé sulfamidé, synthétisé : la DL 50 devient en effet 114 ± 3 mg/kg au lieu de $218 \pm 3,5$ mg/kg pour la désacétylthiocolchicine.

EPREUVES DE PROTECTION CHEZ LA SOURIS -

Nous avons voulu voir si l'injection d'azoglobuline à des souris était capable de protéger ces dernières contre l'haptène chimique copulé grâce à la détermination de la DL 50 chez ces souris protégées.

Technique d'injection -

Injection par voie intra-péritonéale d'une suspension d'azoglobuline humaine à 4% dans un mélange à parties égales de propylène glycol et d'eau physiologique. La dose injectée est de 500 mg/kg soit 0,5 ml de cette suspension pour une souris de 40 g.

Nous avons pratiqué trois injections à une semaine d'intervalle. Les DL 50 ont été déterminées entre quinze jours et un mois après la dernière injection.

- Détermination de la DL 50 chez ces souris "protégées" -

L'essai de toxicité a été pratiqué chez ces souris immunisées qui étaient au départ du même lot de livraison et de poids sensiblement identique (40 ± 3) que celles qui ont servi aux essais de toxicité directe. Il s'agit également du même dérivé sulfamidé provenant du même lot de fabrication, également sous forme de solution à 1% : le produit est dissous dans le propylène glycol et l'on complète à parties égales, en agitant, avec de l'eau physiologique.

... Premier essai

- Pour une dose correspondant à la DL 50% : on a pratiqué un essai sur trois souris immunisées, à 115 mg/kg. Il n'y a eu aucune mort.

- Pour la dose 100% mortelle précédente : à 150 mg/kg et sur cinq souris : on obtient 3 morts en 24 et 48 heures. Une quatrième souris succombe en 72 heures seulement.

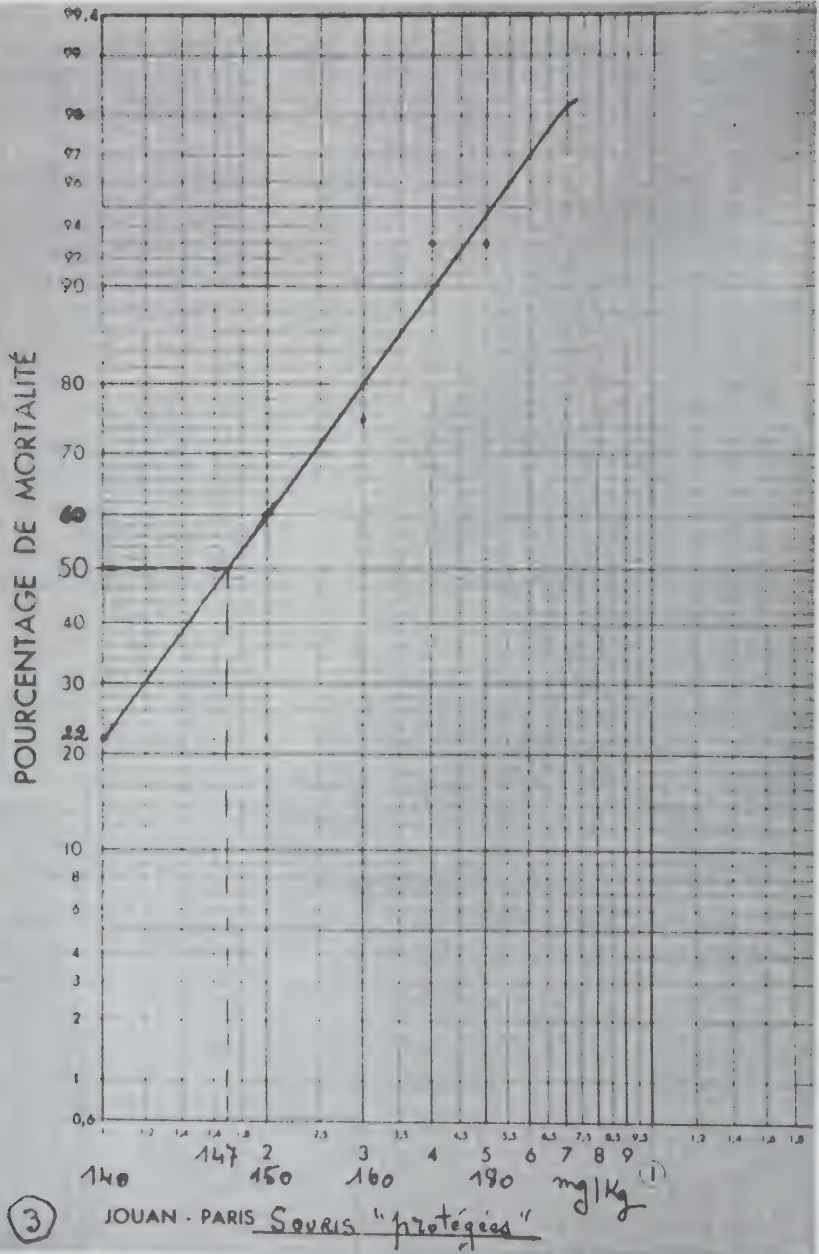
... Essai proprement dit ...

La zone explorée se situe entre 130 et 200 mg/kg avec un total de 10 souris par dose, au moins dans la zone correspondant à la nouvelle DL 50, c'est-à-dire entre 140 et 160 mg/kg.

Résultats

Doses inject.	24h Nbre de morts	48h	72h	Nbre souris inj.	Nbre de morts pour 10 souris
115 mg/kg	0	0	0	3	0
150	3	3	4	5	
130	0	0	0	5	0
140	2	2	4	10	4
150	3	4	4	5	8
160	5	6	6	10	6
180	4	4	4	5	8
190	3	3	3	3	10
200	3	3	3	3	10

Doses injectées mg/kg	morts	vivants	totaux cumulatifs		% décès
			morts	vivants	
200	10	0	46	0	100
190	10	0	36	0	100
180	8	2	26	2	93
160	6	4	18	6	75
150	8	2	12	8	66
140	4	6	4	14	22
130	0	0	0	24	00



Calcul de l'écart type :

$$E = \frac{2 s}{\sqrt{2N}}$$

$$2 s = 168 - 138 = 30$$

$$N = 35$$

$$E = \frac{30}{\sqrt{70}} \quad \text{soit } 3,5$$

La DL 50 du dérivé sulfamide de la désacétylthiocolchicine (voir graphique n° 3) est donc devenue dans le cas des souris immunisées :

$$147 \pm 3,5 \text{ mg/kg.}$$

- Discussion des résultats -

Remarques :

Il faut noter que l'on observe dans le cas des souris immunisées un certain nombre de morts retardées : en 48 heures ou même 72 heures. Ceci témoigne d'une lutte de l'organisme contre la toxicité du produit injecté, le taux d'anticorps formé étant pourtant insuffisant pour le rendre inoffensif.

On observe également des variations individuelles plus grandes que précédemment : pour une dose de 150 mg/kg il y a au total 8 morts sur 10 souris ; à 160 mg/kg : six morts et à 180 mg/kg : huit morts toujours pour dix souris.

Ces résultats semblent témoigner d'une aptitude différente selon les individus à fabriquer des anticorps donc à se protéger.

- Résultats (voir graphiques n° 1 et 3)

Les souris qui ont reçu trois injections à une semaine d'intervalle de 500 mg/kg de produit copulé à des globulines humaines, supportent dans le mois suivant la dernière injection, des doses supérieures à la DL 50 de départ de ce produit non copulé. La DL 50 qui était primitivement de 114 ± 3 mg/kg devient en effet de $147 \pm 3,5$ mg/kg.

De plus, la proportion du nombre des morts en fonction des doses injectées n'est plus aussi régulière que précédemment, ce qui semble montrer une formation d'anticorps d'intensité légèrement variable selon les individus.

Ces résultats sont donc en faveur d'une protection de type immunitaire et confirment les résultats obtenus par immunisation des lapins à l'aide des azoglobulines, comme nous avons pu le mettre en évidence par la réaction de déviation de complément.

A - ESSAIS DE PROTECTION SUR CULTURES CELLULAIRES

D'EMBRYONS DE POULETS

Les expériences de protection in vivo chez la souris ont permis la mise en évidence d'une diminution de la toxicité aiguë du produit que nous avons préparé (le dérivé sulfamidé de la désacétylthiocolchicine) chez des souris préalablement immunisées à l'aide de ce produit diazoté et copulé à des globulines. Ces résultats correspondent à la mise en évidence d'anticorps spécifiques, par réaction de déviation du complément chez des lapins immunisés.

En utilisant la méthode des cultures cellulaires d'embryon de poulet in vitro, nous avons voulu étudier cette protection, non plus de façon globale, mais sur la structure fine de la cellule. Cette technique permet, en effet, grâce à l'examen microscopique d'un tapis de culture unicellulaire, d'étudier les modifications provoquées par un produit introduit dans le milieu de culture, aussi bien sur le noyau que sur le protoplasme de la cellule.

Après expérimentation de la toxicité cellulaire des produits étudiés, désacétylthiocolchicine et son dérivé, nous pouvons donc dans un second temps envisager l'étude de la protection à l'aide de sérums de lapins immuns contre la toxicité de ces produits.

- TECHNIQUE DE LA CULTURE CELLULAIRE -

Ces cultures sont pratiquées in vitro soit sur la surface interne d'un flacon de 250 ml dit flacon "pharmacie" ou plus

souvent, pour ces essais, dans des petits flacons à lamelle, les cellules se développent sur la surface de la lamelle à l'intérieur du flacon qui contient lui même le milieu de culture (23, 71).

Cette technique permet d'obtenir un tapis uniforme de cellules en couche unicellulaire, grâce à une richesse d'ensemencement contrôlée, à partir d'embryons de poulets d'âge bien défini, et en évitant toute contamination en cours d'opération. Elle permet d'effectuer ces expériences de cytotoxicité comparative à des témoins de culture cellulaire et de discuter ainsi les résultats obtenus avec le maximum de sécurité (39).

== UN CERTAIN NOMBRE D'IMPERATIFS SONT A RESPECTER -

Il faut posséder au moment de l'expérience des embryons de poulets d'un âge bien défini.

A partir des tissus dilacérés de ces embryons, obtenir des cellules isolées qui en se multipliant donneront un tapis uniforme sur les lamelles de culture, ce qui est réalisé grâce à la trypsination.

-- Eviter les contaminations des cultures et travailler stérilement au long de ces manipulations.

- EMBRYONS -

Ceux-ci doivent être en parfaite santé et d'âge bien défini

Pour cela les oeufs sont mis à incuber dès réception dans une couveuse artificielle avec incubateur type "Mammouth" à une température optimale de 39°5 - 39°8. De plus l'aération réalisée grâce à des pales mues par un moteur, et les conditions, hygrométriques (70% d'humidité) sont bien réglées.

Il faut recevoir ces oeufs à une date bien déterminée, de façon à disposer au moment de l'expérience d'embryons de 12 - 13 jours. A ce moment, les embryons sont suffisamment développés et n'ont pas encore de plumes gênantes ultérieurement.

Le jour de l'expérience, les oeufs seront examinés au microscope pour s'assurer d'une vitalité satisfaisante de l'embryon.

- OBTENTION DE CELLULES ISOLEES -

Les embryons de 12 - 13 jours, bien vivants, sont débarrassés de la tête, des pattes et des ailes et soumis à l'action de la trypsine, stérilement sous agitation magnétique (4, 5, 11, '73).

La trypsine est ensuite éliminée par lavages et centrifugation à vitesse lente (inférieure à 1 000 tours/minute) ainsi que les amas cellulaires qui pourraient subsister, par décan-tation.

- CONDITIONS DE STERILITE -

Celles-ci sont ESSENTIELLES et doivent être scrupuleuse-ment respectées.

-- le tissu de départ est stérile; l'oeuf est vivant donc l'embryon n'est pas contaminé. Le prélèvement de l'embryon de-vra donc se faire avec le maximum de rapidité et de stérilité.

-- les instruments et la verrerie seront stérilisés à l'autoclave et les solutions stérilisées par la chaleur ou sur filtre Seitz pour les composants qui ne supportent pas la cha-leur, cas de la trypsine par exemple.

Il faut à tout prix éviter l'apport de contamination ex-terne. La pièce sera stérilisée préalablement aux rayons ul-tra-violets grâce à des rampes disposées notamment au-dessus de la paillasse de travail. Cette pièce sera aussi stérile que possible, et l'on s'abstiendra d'allées et venues avec l'exté-rieur tout le temps des manipulations.

Les lampes à ultra-violets sont allumées pendant 1 à 2 heures avant le début des expériences; à ce moment elles sont éteintes et l'on opère tout de même stérilement dans la flamme d'un bec bunsen.

Lorsque l'essai porte sur un grand nombre de cultures, les manipulations (débouchage, et rebouchage de flacons, étant longues, on peut utiliser avec profit une cage de plastique dont l'atmosphère aura été préalablement stérilisée aux rayon-nements ultra-violets. Les flacons peuvent rester débouchés dans cette cage le temps nécessaire aux manipulations.

On s'entoure d'une précaution supplémentaire par addition au milieu de culture d'antibiotiques : pénicilline, streptomycine. On peut également utiliser avec bénéfice un antifongique.

- QUALITE DES VERRES ET BOUCHONS -

C'est également un facteur important de réussite :

- verres d'excellente qualité (pyrex ou pharmaceutique) uniquement affectés à ce travail.

- bouchons en caoutchouc gris ou blanc uniquement.

- le nettoyage de la verrerie est délicat : nous avons essayé la plupart des détergents actuellement dans le commerce et ils sont nombreux. De toute façon, il faut effectuer d'abondants rinçages à l'eau distillée.

Verrerie et bouchons sont stérilisés à l'autoclave.

- MILIEUX ET REACTIFS -

Le milieu utilisé est celui à l'hydrolysate de caséine (58, 59) :

Hydrolysate de caséine enrichi d'une solution concentrée de

- vitamine B

- acide folique

- biotine

glutamine, cystéine, acide ascorbique, alpha-tocophérol.

- COMPOSITION DU MILIEU A L'HYDROLYSAT DE CASEINE -

- Hydrolysate de caséine.....	0,5 g
glutamine	0,1
cystéine (Chte)	0,01
niacine	0,001
- pyridoxine	0,001
thiamine (aneurine)	0,001

- riboflavine	0,0001
- pantothénate de calcium	0,001
- acide para-amino-benzoïque	0,001
- choline	0,001
- biotine	0,001
- acide folique	0,001
- alpha tocophérol	0,001
- acide ascorbique	0,025
- liquide de Earle	Q.S.P. 1 litre

Ce milieu est préparé et délivré en ampoules stériles par l'Institut Pasteur, sous forme concentrée (10 fois) de deux ampoules :

- l'une contenant une solution concentrée des différents constituants,

- l'autre contenant le carbonate acide de sodium et l'indicateur coloré, le rouge de phénol.

Ces ampoules sont conservées au réfrigérateur. Au moment de l'emploi, on effectue le mélange et complète par addition d'eau distillée stérile, au volume indiqué.

Ce milieu est en outre enrichi extemporanément par addition de sérum de veau ou de poulain (Institut Pasteur). Ces sérums sont conservés par congélation à - 15°.

Il faut prévoir de les décongeler et de les centrifuger 10 minutes à 6 000 tours/minute avant addition au milieu à raison de 5%.

Cette centrifugation a une influence pratique très nette sur la qualité des cultures et nous utilisons actuellement le sérum de veau.

Le milieu est également additionné, comme nous l'avons dit d'antibiotiques :

- pénicilline 200 unités /ml de milieu

- streptomycine 0,04 mg /ml.

- LES AUTRES REACTIFS SONT :

- la solution saline : solution de Hanks dont voici la formule

Na Cl	8	g
K Cl	0,4	
Mg SO ₄ , 7 OH ₂	0,2	
Ca Cl ₂	0,14	
Na ₂ HPO ₄ 12 OH ₂	0,15	
glucose	1	
rouge de phénol (solution à 0,2 %)	10	ml
eau distillée	q;s;p;	1 litre

- la solution de trypsine : trypsine purifiée Difco à 1/250 conservée au congélateur et mise en solution extemporanément à raison de 0,5 % dans la solution saline de Hanks. La solution est filtrée sur Seitz au moment de l'emploi (disque SS.)

TECHNIQUE GENERALE DE CULTURE CELLULAIRE (71)

- Séparation des embryons -

Après stérilisation de la pièce aux rayons ultra-violets pendant 1 à 2 heures, on prépare la solution de trypsine à 0,5% qui filtrera pendant le début des manipulations.

On choisit 4 embryons bien vivants parmi les oeufs incubés de 12 à 13 jours et après examen au mireur.

Près du bec bunsen, dans la pièce stérile, sur la pailasse stérilisée par une rampe à ultra-violet, recueillir le contenu des oeufs dans des boîtes de Petri stériles.

.. Séparer les embryons et couper avec les ciseaux stériles les parties non utilisées (ailes, pattes, tête).

- Transporter les embryons stérilement dans une fiole Fourneau et hacher aussi finement que possible à l'aide des ciseaux flambés à nouveau sur toute la longueur qui pénétrera dans la fiole.

- On lave ensuite avec une solution de Hanks pour chasser le sang et le vitellus.

- Obtention des cellules isolées : par trypsination.

On verse dans la fiole 50 ml de solution à 0,5 % de trypsine, stérilisée sur filtre Seitz et dispose sur l'agitateur magnétique (agitateur en téflon flambé à l'alcool) à vitesse modérée, pendant 1 heure 30 à la température du laboratoire.

La solution de trypsine est ensuite séparée par centrifugation à faible vitesse (inférieure à 5 000 tours/minute) et remplacée par la solution de Hanks ; on fait deux lavages successifs avec cette solution contenant des antibiotiques, par centrifugation dans les conditions indiquées.

On obtient ainsi trois culots cellulaires si l'on a centrifugé dans les pots de 25 ml).

- CULTURE PROPREMENT DITE -

Il faut réaliser une suspension cellulaire de richesse convenable. Pour cela, on met en suspension le ou les culots cellulaires précédemment obtenus, dans une petite quantité de milieu contenu dans une fiole de Fourneau. On décante alors pour éliminer les quelques rares amas cellulaires restants et on mélange à une quantité suffisante de milieu à l'hydrolysât de caséine (préparé comme il a été indiqué précédemment) pour obtenir une concentration en cellules suffisante. Pour cela, on effectue une numération des cellules à l'hématimètre de Mallassez (Les hématies de poulets étant nucléées, il faut se garder de les confondre, s'il en subsiste, avec les cellules capables de se multiplier).

En pratique, avec 4 embryons on fait une suspension dans 250 ml de milieu.

Cette suspension cellulaire peut être répartie :

· soit en grande fiole (culture directe sur le verre)

· soit en petits flacons où l'on introduit une lamelle qui permettra l'examen direct des cultures, après fixation et coloration dans ce même flacon.

La richesse de l'ensemencement doit également tenir compte de la quantité de milieu, donc du volume du flacon.

- 1 500 à 2 000 cellules/mm³ pour les grandes fioles,
- 3 500 à 4 000 cellules/mm³ pour les petits flacons

Lorsque l'on a préparé une suspension à concentration satisfaisante, on répartit dans les flacons de façon à recouvrir le flacon ou la fiole lorsqu'ils sont disposés à plat mais sans que le milieu vienne toucher les bouchons (20 ml environ pour un grand flacon).

Dans le cas des petits flacons à lamelle, on répartit 1,8 ml par flacon avec la seringue de Cornwall (préalablement stérilisée) qui facilite et accélère la répartition et d'autre part contribue à une bonne séparation des cellules. Il faut vérifier que les bouchons ferment assez hermétiquement pour assurer une anaérobiose relative et l'on dispose ces flacons, lamelles en bas, à plat, horizontalement à l'étuve à 37°.

Les grandes fioles sont également soigneusement bouchées avec des bouchons de caoutchouc stériles, de taille convenable.

Le milieu est renouvelé toutes les 48 heures, au moins au début ; on se fie ensuite au virage de l'indicateur

- EXAMEN DES CULTURES -

Il peut se faire à travers l'épaisseur du verre pour les petits flacons et surtout les grandes fioles, au microscope à faible grossissement. On peut ainsi juger de la répartition cellulaire et de l'homogénéité de la culture.

Examen après fixation, coloration et montage notamment pour les lamelles des petits flacons. Les lamelles peuvent alors être examinées si besoin à l'immersion de façon à étudier la structure cellulaire et ses modifications éventuelles.

- FIXATION ET COLORATION -

On peut la réaliser facilement dans le flacon qui a servi à la culture.

Le milieu de culture est éliminé en prenant garde de ne pas entraîner la lamelle avec le liquide. Egoutter soigneusement.

Le milieu est remplacé par de l'alcool méthylique de façon à remplir le flacon, en position debout, on laisse agir 10 minutes.

Rejeter à son tour le méthanol et évaporer convenablement en renversant les flacons.

On peut alors faire un examen à l'état frais ou colorer par le May-Grunwald-Giemsa :

- remplir les flacons à lamelles de colorant de May-Grunwald pur, que l'on laisse agir 10 minutes.

- on lave alors à l'eau distillée neutre (ou du robinet) que l'on remplace aussitôt par une dilution du colorant de Giemsa au 1.14 dans l'eau distillée neutre. Laisser agir pendant 20 minutes.

- on rejette le colorant, lave abondamment et laisse sécher.

Les lamelles peuvent alors être montées au baume du Canada, ce qui permet de les conserver très longtemps : pour cela retirer la lamelle du flacon à l'aide de pinces courbes spéciales.

On déshydratera en passant rapidement la lamelle, successivement dans deux vases de Borrel contenant de l'acétone et deux autres contenant du toluène.

On monte alors ces lames au baume du Canada.

- EXAMEN DES CULTURES -

Les cultures normales font voir des cellules fusiformes, fibrocytes ou fibroblastes (cellules conjonctives) à cytoplasme clair, assez étendu, fusiforme, envoyant dans le milieu ambiant de fins pseudopodes à base large ; noyau ovale à nucléoles. Les cellules n'adhèrent pas étroitement entre elles, mais sont alignées parallèlement les unes aux autres donnant un aspect régulier et harmonieux (voir planche n°1).

APPRECIATION DE L'ACTION CYTOTOXIQUE DU PRODUIT INTRODUIT DANS LE MILIEU DE CULTURE .

On peut observer l'arrêt de la prolifération cellulaire et la perte de l'intégrité des cellules, pouvant aller jusqu'à la mort. Ce qui peut être décelé microscopiquement par l'absence de virage de l'indicateur du milieu de culture après 48 heures qui témoigne d'un défaut de respiration cellulaire.

L'examen microscopique des lamelles colorées permet ;

- à un faible grossissement : l'étude de l'aspect de la culture, de sa richesse en cellules, de la taille de ces dernières, du rapport nucléo-cytoplasmique, etc...

- aux forts grossissements pouvant aller jusqu'à l'examen à l'objectif à immersion : une étude fine de la morphologie des cellules et des altérations nucléaires ou cytoplasmiques qu'elles peuvent présenter.

- ESSAIS DE TOXICITE DU PRODUIT -

Les modalités de ces essais peuvent être variables. Il faut choisir le moment d'introduction du produit toxique en fonction de l'âge de la culture. Le produit à étudier peut être mis en contact avec des cellules, en cultures depuis 12 ou 24 heures, donc adaptées à leurs nouvelles conditions de vie et qui se sont déjà abondamment développées. Mais dans le cas de l'étude d'un produit actif sur les multiplications, il importe de saisir le moment où la phase de multiplication cellulaire est la plus intense, et de faire agir par exemple la N-désacétylthiocolchicine à ce moment. Comme il suffit d'une à deux heures pour que les cellules se déposent et se collent au verre ou à la lamelle, on peut introduire le produit à ce moment ce qui facilitera l'étude de l'activité antiméiotique du produit.

De même l'examen des cultures après addition du produit à étudier peut se faire à des intervalles de temps variables : 24 h - 48 h - 72 h et plus s'il s'agit d'observer une atteinte à long terme. Toutes les 2 ou 6 heures si l'on veut observer au contraire un effet aigu ou à court terme.

Il suffit de préparer autant de flacons à lamelles que de dilutions du produit à utiliser et en quantités suffisantes pour qu'un certain nombre de flacons correspondant à chaque dilution puissent être fixés dans les intervalles de temps choisis.

On doit également déterminer l'échelle des doses de produit à introduire dans le milieu de culture. Si les doses sont trop faibles l'effet sera nul et si elles sont très fortes, il y aura destruction de la culture cellulaire. Il faut donc délimiter des doses intermédiaires si l'on veut observer des modifications cytoplasmiques ou nucléaires, plus spécifiques de l'activité d'un produit qu'une toxicité massive. Pour éviter que les expériences ne prennent une ampleur trop considérable, on commencera par étudier des doses assez espacées pour, dans un second temps, rapprocher les doses dans la zone estimée intéressante.

- SCHEMA OPERATOIRE -

Nous avons opérés ces essais de toxicité sur les trois produits étudiés à savoir :

- la N-désacétylthiocolchicine ;
- son dérivé p. amino benzène sulfamide
- l'azoglobuline.

Chacun de ces trois produits est introduit dans le milieu de culture sous un volume constant, mais correspondant à des dilutions croissantes généralement de 10^{-4} à 10^{-10} . On effectue ensuite des dilutions plus serrées dans la zone intéressante à étudier.

Ces dilutions sont réalisées de la façon suivante :

- lorsque le produit est soluble dans l'eau, la dissolution est pratiquée dans la solution de Hanks, à froid ou en s'aidant d'un chauffage modéré si cela est nécessaire et si le produit peut le supporter.

- dans le cas contraire, la substance (dérivé sulfamidé) est dissoute dans le propylène glycol qui est sans effet à cette dose sur les cellules.

Dans les deux cas, les dilutions supérieures sont effectuées à l'aide de la solution de Hanks.

- CALCUL DES DILUTIONS

Chaque flacon lamelle a reçu au cours de ces expériences

- 1,6 ml de milieu à l'hydrolysate de caséine,
- 0,2 ml de la dilution du produit à étudier.

On obtient donc au total le volume de 1,8 ml correspondant aux cultures cellulaires précédentes et le produit actif est ainsi dilué au 1/9ème. (On ne peut introduire plus de 1,8 ml de liquide pour éviter le contact du milieu avec les bouchons, lorsque les flacons sont en position horizontale).

Dans la préparation des dilutions de produit, il faut donc tenir compte de cette dilution au 1/9, étant entendu que nous ne parlerons par la suite que des dilutions finales, totales.

Si l'on veut obtenir une dilution finale de 10^{-4} , il faut donc faire au préalable une dilution de 9×10^{-3} . Par exemple, avec 90 mg de produit dans 10 ml de Hanks. A partir de ce tube, on fait des dilutions sérologiques au 1/10 (1 ml + 9 ml de liquide de Hanks) qui donneront 9×10^{-4} , 9×10^{-5} , 9×10^{-6} , etc.

On introduira ensuite, comme il a été dit 0,2 ml de chacune de ces dilutions dans 1,6 ml de milieu de culture. La dilution réelle sera alors de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , etc.

La culture s'effectue ensuite en flacons à lamelles comme il a été décrit précédemment. Les flacons bien bouchés, convenablement étiquetés sont mis à l'étuve à 37° en position horizontale, lamelle en contact avec le milieu. A l'issue des différentes périodes de contact, on fixe par exemple trois à cinq lamelles pour chaque dilution étudiée et autant de témoins n'ayant pas reçu de produit.

Une fois les lames fixées, on peut faire les colorations en série à la fin de l'expérience, selon la technique décrite précédemment au May-Grunwald-Giemsa et montage s'il y a lieu au baume du Canada.

- DIFFERENTES EXPERIENCES REALISEES -

Première série d'expériences :

Dilutions de chacun des trois produits 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} à 10^{-10} pour la N-désacétylthiocolchicine.

- le produit prêt à être diazoté,
- l'azoglobuline.

Introduction du produit dans des cultures âgées de 24 heures.

Temps de contact produit-culture cellulaire : fixation un, deux, trois et quatre jours après l'introduction du produit.

Chaque série d'expériences représente un travail important ; ces cultures nécessitent en effet :

- au moins trois flacons pour chaque cas envisagé, de façon à déceler une anomalie de culture, un flacon sale par exemple.

- des témoins de culture à chaque temps de fixation si l'on veut comparer la richesse cellulaire, le nombre des mitoses.

- des témoins de culture au moment où l'on introduit la substance active dans le milieu.

Ce qui fait que pour un seul produit étudié sous trois dilutions différentes, avec quatre temps différents de contact, on doit disposer d'une cinquantaine de flacons à lamelles, qu'il faudra ensuite colorer et surtout examiner et comparer. Chaque série d'expériences précédemment décrites a donc donné lieu en réalité à cinq ou six essais de cinquante flacons chacun, demandant chacun une semaine. Ce sont donc des essais qui nous ont occupé pendant de nombreux mois.

A titre d'exemple, le tableau ci-contre résume la marche à suivre et indique le nombre de flacons à utiliser dans un essai de ce type.

	Témoins	Essais
milieu de culture cellulaire (ml)	1,8 1,8 1,8 1,8 1,8	1,6 1,6 1,6 1,6
Produit - dilution 10^{-4}		
10^{-5}		0,2 0,2 0,2 0,2
10^{-6}		
Fixation après .	0h 2h 5h 18h 24h	2h 5h 18h 24h de même pour 10^{-5} et 10^{-6}
Nombre de flacons	2 2 2 2 2	3 3 3 3 total 46

- Seconde série d'expériences -

Dilutions de chacun des trois produits : 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-10} .

- Introduction du produit dans des cultures âgées de 15 heures

- Temps de contact, donc fixation 6h - 10h - 24 h et 48 h après l'introduction du produit.

- Troisième série d'expériences -

- Dilutions de chacun des trois produits 10^{-4} , 10^{-5} , etc... 10^{-10} .

- Introduction du produit dans des cultures âgées de 2 heures.

- Temps de contact : donc fixation 2 h - 5 h - 18 et 24 h après l'introduction du produit.

- Quatrième série d'expériences -

- Dilutions de chacun des trois produits :

10^{-5} ; 5×10^{-6} ; 10^{-6} ; 5×10^{-7} ; 10^{-7}

- Introduction du produit dans des cultures âgées de 2 heures.

- Temps de contact, donc fixation 2 h - 5 h - 18 et 24 heures après l'introduction du produit.

- Résultats et discussion (voir planches II, III et IV) -

L'action de ces produits sur les cultures cellulaires d'embryon de poulet montre :

- *aux doses élevées* : une action toxique intense avec disparition du tapis cellulaire uniforme et continu, caractéristique de la culture de fibroblastes, telle qu'on peut l'observer sur les lamelles-témoins. Seuls subsistent ici quelques îlots épais de cellules arrondies, petites, presque dépourvues de cytoplasme, aux noyaux fortement basophiles, méconnaissables en tant que fibroblastes. Ceci avec une concentration de 10^{-5} ou supérieure et un contact de 24 h pour la N-désacétylthiocolchicine, de 5×10^{-5} et même 10^{-6} pour son dérivé sulfamidé.

- *à des doses moins fortes* : on assiste aux modifications dans la substance du noyau et du cytoplasme, beaucoup plus spécifiques du produit étudié et qui ne relèvent plus seulement d'un phénomène de toxicité. On observe des altérations concernant l'aspect général de la culture, mais également des modifications nucléaires et une atteinte de la multiplication cellulaire.

- *à un faible grossissement* : la modification de l'aspect général de la culture est frappante : il y a perte de cet aspect rayonnant, symétrique et ordonné, transformation de chaque cellule, qui d'allongée et fusiforme devient polyédrique ou

arrondie, beaucoup plus petite avec tendance à perdre le contact avec les cellules voisines. On observe encore une culture sur toute la surface de la lamelle, mais la couche cellulaire est interrompue par endroits et les cellules sont elles-mêmes espacées, arrondies ayant perdu cet aspect étoilé rayonnant des fibroblastes normaux.

- à un fort grossissement : comme l'objectif à immersion, on peut déceler des modifications cytoplasmiques et nucléaires. Le cytoplasme de certaines cellules est constitué de nombreuses vacuoles presque contigües qui dénotent une action dégénérative certaine. Les noyaux qui se sont arrondis, sont très profondément modifiés, avec altération de la chromatine, multiplication et fragmentation des nucléoles. Ces altérations nucléolaires sont d'ailleurs à retenir notamment en ce qui concerne le produit sulfamidé et son azoglobuline. Les fibroblastes normaux contiennent généralement deux nucléoles punctiformes disposés souvent aux extrémités du noyau. Après action des produits certains nucléoles prennent un aspect allongé et plus ou moins ramifié, restent aux deux pôles du noyau, ou ressemblent à des chainettes plus ou moins incurvées, situées au centre du noyau. cet aspect est plus fréquent dans le cas du dérivé sulfamidé pour des concentrations de 5×10^{-7} et 10^{-8} (fig. 9) ainsi que dans celui de l'azoglobuline pour des concentrations de 10^{-5} (fig. II).

On peut noter également la présence de prophases de type anormal constituées de chromosomes fractionnés, en chapelets (fig. 12). Mais l'action la plus caractéristique de ces produits est un blocage des mitoses au début de la métaphase qui entraîne l'apparition de cellules nouvelles : ce sont des cellules, petites, rondes, très fortement basophiles et dans lesquelles la chromatine est condensée, généralement au centre de la cellule, sous forme d'une masse hyperbasophile, pycnotique. Ces cellules correspondent à un blocage des mitoses au stade de la métaphase et constituent jusqu'à 70% des éléments présents pour des concentrations de N-désacétylthiocolchicine de 10^{-6} à 10^{-7} , c'est-à-dire 98 à 100% des cellules en multiplication (fig. 5 et 6). On trouve également ces cellules dans le cas du dérivé sulfamidé mais en nombre plus faible, 50 à 60% des cellules présentes (fig. 8), et dans la proportion d'un tiers environ dans le cas de l'azoglobuline introduite dans le milieu de culture aux doses de 10^{-4} à 10^{-5} (fig. 10).

Ces cellules correspondent donc à un blocage des mitoses sous l'action des produits étudiés et caractérisent ce que certains auteurs ont dénommé la prométaphase pycnotique ou pycnométaphase. Cette action est très nette dans le cas de la désacétylthiocolchicine, et légèrement moins prononcée dans le cas de son dérivé sulfamidé. Ce dernier, par contre, présente une toxicité plus élevée. L'action de l'azoglobuline est très voisine de celle observée pour le dérivé sulfamidé, si l'on utilise des concentrations plus élevées, 10^{-4} à 10^{-5} au lieu de 10^{-8} .

B - ESSAIS DE PROTECTION SUR CULTURES CELLULAIRES

D'EMBRYON DE POULET.

La protection des cultures cellulaires à l'aide d'immun sérums spécifiques du produit étudié, peut se concevoir selon deux modalités principales. On peut effectuer un contact préalable entre cette substance et le sérum immun et observer ensuite si le mélange est toujours toxique, ou produit les mêmes modifications sur ces cultures. Mais cette méthode suppose l'introduction de l'antigène à une dose juste équivalente et est plutôt valable dans le cas où l'on veut épuiser un sérum en anticorps plus que dans le cas présent. Nous avons donc préféré, après un certain temps de culture, généralement le temps nécessaire aux cellules pour se coller à la lamelle et commencer leur multiplication, introduire le sérum de lapin immun et rechercher une diminution ou une neutralisation éventuelle de l'action du produit étudié.

- MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE DE PROTECTION CELLULAIRE -

Nous pensions donc opérer en deux temps :

- effectuer une culture cellulaire selon la technique précédemment décrite : après trypsination et en présence de sérum de veau à 5%, ce dernier étant très important pour réaliser une fixation convenable des cellules sur les lamelles. Après deux heures environ de séjour des flacons à lamelles, en position horizontale à l'étuve à 37° , il s'est déjà constitué un tapis uniforme unicellulaire et la multiplication est intense.

Après deux heures de contact, remplacement d'une part du sérum de veau par du sérum de lapin (de façon à éviter un excès de sérum) et d'autre part, introduction du produit à étudier aux dilutions précédemment déterminées. Nous pensions utiliser les sérums de lapins purs, à raison de 0,10 ml pour 1,7 ml de milieu, de façon à apporter le maximum d'anticorps.

L'expérience nous a prouvé que le sérum de lapin, qu'il soit normal ou immunisé, n'était pas sans effet sur les cultures cellulaires. L'état de stérilité du sérum (pollution possible au cours de la saignée) n'est pas en cause, car nous avons opéré sur des sérums filtrés sur disques S.S. Nous avons également rejeté tout sérum contenant les moindres traces de conservateur. Cet inconvénient semble donc lié au sérum de lapin lui-même.

Nous avons alors pensé à diluer le sérum de lapin au 1/5 et au 1/10 et avons effectué des essais de cultures cellulaires en présence de sérum de veau, et de sérum de lapin normal aux dilutions ci dessus indiquées. Plusieurs séries d'expériences nous ont amené à utiliser la technique suivante :

- Technique utilisée -

Culture cellulaire selon le principe général décrit précédemment : trypsination et introduction de milieu de culture avec 5% de sérum de veau. Le volume de milieu introduit est calculé de façon à ne pas dépasser au total 1,8 ml (pour éviter le contact du milieu avec le bouchon lorsque les flacons sont en position horizontale)

Après deux heures de culture, introduction dans les flacons destinés aux essais, d'une part du sérum de lapin immun dilué au 1/5 ou au 1/10, d'autre part, du dérivé p. amino benzène sulfonyl de la N-désacétylthiocolchicine.

Etude de l'effet produit après 24 heures de contact - temps au bout duquel les cellules sont fixées au méthanol.

Cette technique requiert la mise en oeuvre d'un certain nombre de témoins :

- témoins de culture cellulaire, après deux heures de contact et après 24 heures;

- témoins de toxicité : de façon à vérifier que le produit introduit seul apporte les modifications déjà observées;

témoins de sérum : avec chaque sérum de lapin immun dilué au 1/5 et au 1/10 pour vérifier l'inocuité de ces sérums sur la culture cellulaire

témoins d'activité du sérum de lapin immun en remplaçant ce dernier dans les essais de protection par du sérum normal.

Le sérum de lapin dilué est introduit sous un volume de 0,10 ml ainsi que le produit (au lieu de 0,20 ml pour ce dernier lors des expériences de toxicité : on tient compte lors de la préparation des dilutions préalables). Le volume total est de 1,80 ml par flacon à lamelle.

Les dilutions du dérivé sulfamidé de la N-désacétylthio colchicine utilisée ont été de 10^{-5} , 5×10^{-7} et 10^{-8} .

Voici par exemple le schéma d'exécution d'une réaction

	Témoins de culture		T, sérums	T, Toxicité	T, d'activité du sérum	Essais de pro- tection.
Milieu de culture	1,80	1,80	1,70 1,70	1,70 1,70 1,70	1,60 1,60 1,60	1,60 1,60 1,60
+ sérum veau 5%						
Sér. lap N1 1/5			0,10		0,10 0,10 0,10	
Sér. lap I 1/5			0,10			0,10 0,10 0,10
Produit 10.5				0,10	0,10	0,10
Produit 5 x 10 ⁷				0 10	0 10	0 10
Produit 10.8				0 10		
Fixation après	2h	24h	24h	24h	24h	24h
Nombre de flacons	3	3	6	9	9	15
					TOTAL	45. ... en préparer 50

RESULTATS.

Après vérification de la marche normale de la culture cellulaire, par examen des témoins de culture et des témoins de sérums, la comparaison soigneuse et renouvelée des lames correspondant aux essais de protection avec celles des essais de toxicité, compte tenu des témoins du sérum immun, nous a amené aux conclusions suivantes :

- pour une concentration en dérivé sulfamidé de 10^{-5} , on note peu de différence avec les lames de toxicité correspondante.

- par contre pour les dilutions de 5×10^{-7} et 10^{-8} , si l'action du produit n'est pas totalement supprimée, on peut observer une amélioration nette en présence de sérum immun dans le cas des trois sérums étudiés

- à un faible grossissement : les lames apparaissent plus riches en cellules ; l'aspect est plus uniforme, assez étalé sans "trous" importants dans la culture.

pour des grossissements plus importants, on observe un plus grand nombre de fibroblastes allongés à noyaux normaux semblables à ceux des témoins. Les protoplasmes sont également moins souvent atteints et les vacuoles peu nombreuses. Nous n'avons pas noté d'altérations nucléolaires et s'il subsiste encore quelques cellules basophiles à noyau pycnotique, celles-ci sont nettement plus rares, jamais supérieures à une par champ, à un grossissement moyen, soit de l'ordre de 5% maximum des cellules totales. D'autre part, on peut noter à nouveau des figures de mitose normales. On peut donc conclure à un effet de protection appréciable entre l'activité antimitotique du dérivé sulfamidé de la N-désacétylthiocolchicine.

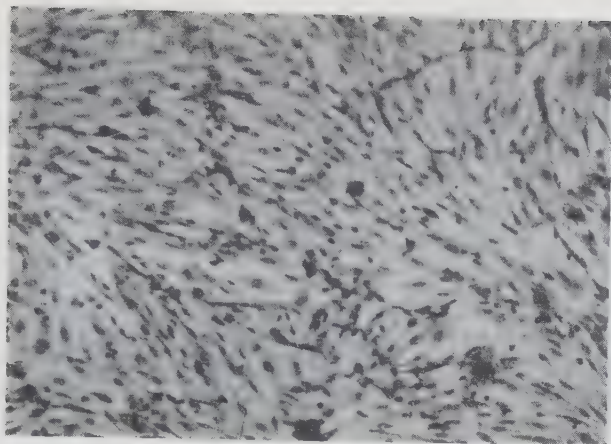


Photo 1
Culture de 24 h.
de fibroblastes
d'embryons de pou-
lets, non traitée
Aspect normal.
(x 125)

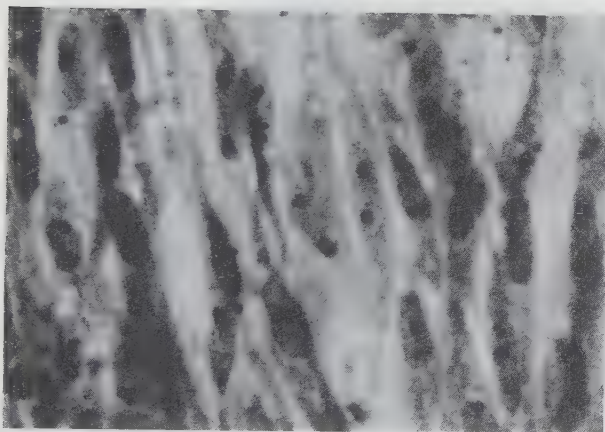


Photo 2
Même culture.
(x 500)

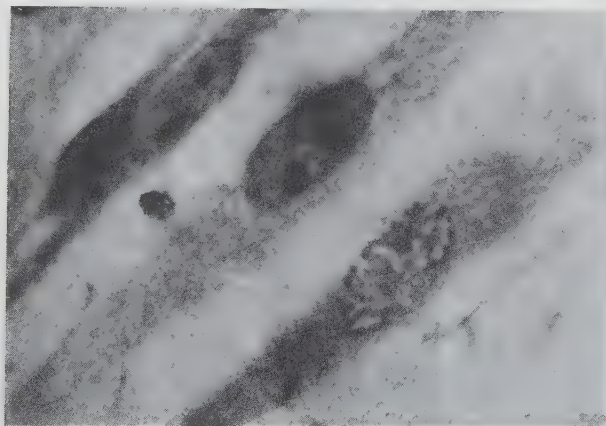


Photo 3
Même culture.
(x 1250)

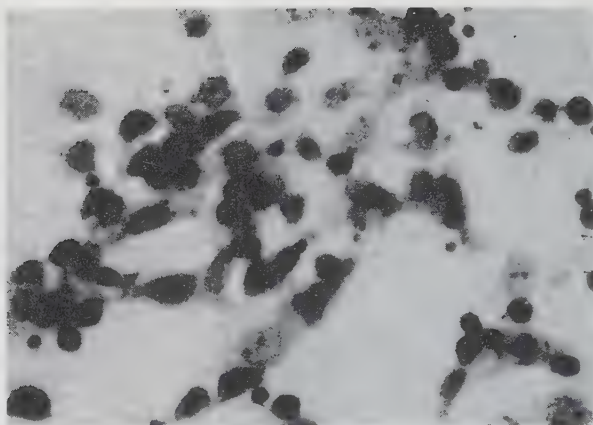


Photo 4

N. désacétylthio-
colchicine.
Concentr. 10^{-4} .
Contact: 24h.
(x 500)

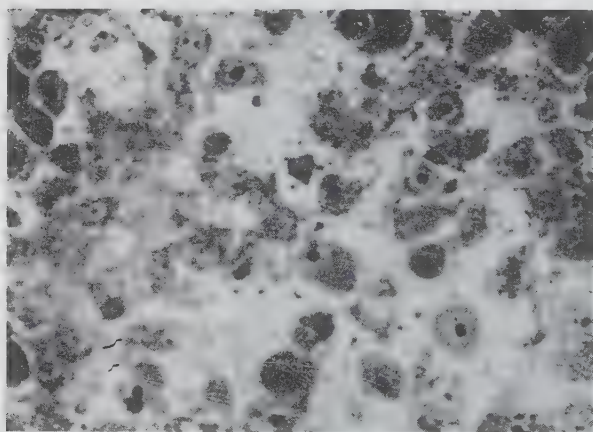


Photo 5

Même culture.
Concentr. 10^{-8} .
Contact: 24h.
(x 500)

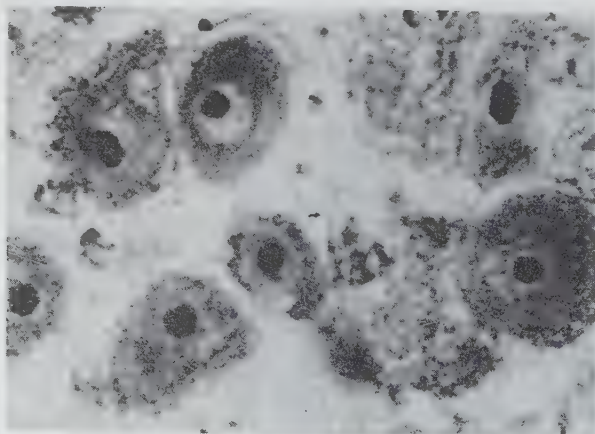


Photo 6

Même culture.
Concentr. 10^{-7} .
Contact: 24h.
(x 1250)

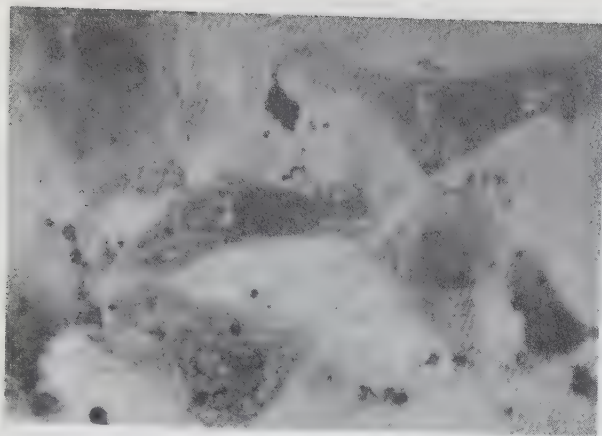


Photo 7

Dérivé sulfamidé
de la Désacétyl-
thiocolchicine.
Concentr. 10^{-4} .
Contact: 48h.
(x 1250)

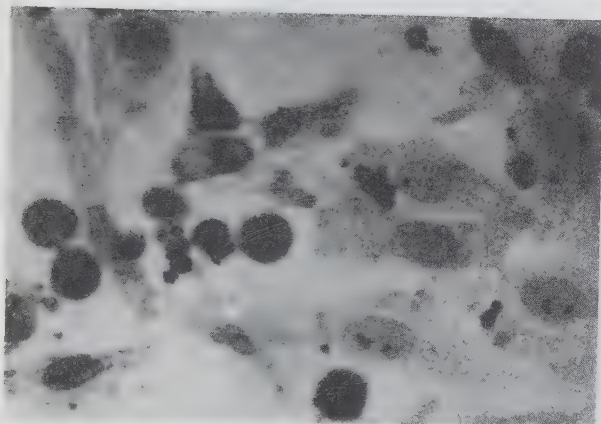


Photo 8

Même culture.
Concentr. 10^{-7} .
Contact: 24h.
(x 1259)

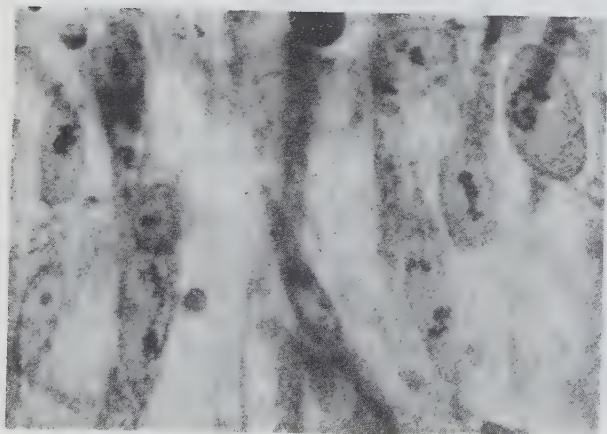


Photo 9

Même culture.
Concentr. 10^{-8} .
Contact: 48h.
(x 500)

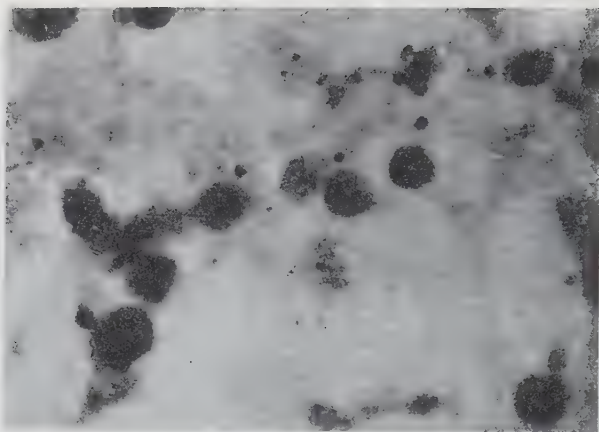


Photo 10
Azoglobuline
Concentr. 10^{-4} .
Contact: 72h.
(x 500)

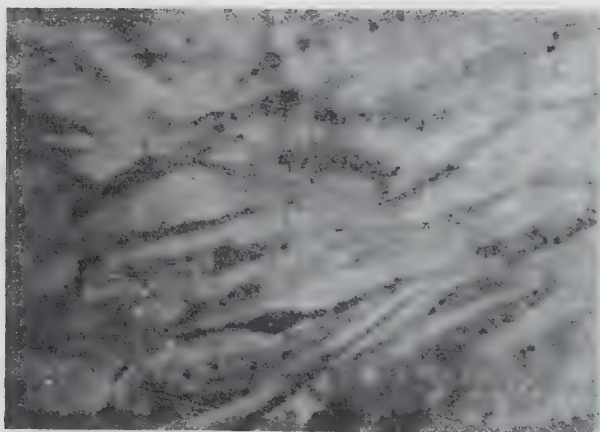


Photo 11
Azoglobuline
Concentr. 10^{-5}
Contact: 72h
(x 500)

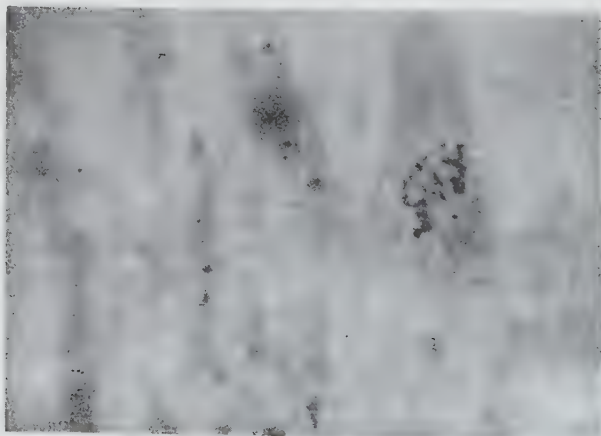


Photo 12
Azoglobuline
Concentr! 10^{-5} .
Contact: 72h
(x 1250)

DISCUSSION DES RESULTATS

Au cours de ce travail, nous avons été amené à nous diriger dans des directions assez différentes : dans le domaine chimique pour transformer le produit choisi, la N-désacétylthiocolchicine, en un dérivé diazotable et copulable aux globulines. Nous avons finalement abouti à la préparation du dérivé p. amino-benzène-sulfonyl de la N-désacétylthiocolchicine.

Dans le domaine de l'immuno-chimie et de la sérologie, notre but était de mettre au point une technique de diffusion en gélose adaptée à un antigène peu soluble et peu diffusible; par la pratique de réactions de déviation du complément, nous avons pu mettre en évidence les anticorps formés, dans le sérum des animaux immunisés.

Dans le domaine de la pharmacodynamie et de la toxicologie, nous avons effectué des études de toxicité aiguë et de protection, *in vivo* chez la souris.

Ces essais de toxicité et de protection ont été également réalisés *in vitro* en cultures cellulaires de fibroblastes d'embryons de poulets. Ces expériences, ont été pratiquées en flacons à lamelles : ces dernières permettent le développement d'une couche unicellulaire de fibroblastes et sont ensuite directement colorées et examinées au microscope. Nous avons mis au point une technique d'essai de protection *in vitro* sur culture cellulaire d'embryon de poulet.

Nous avons donc choisi d'étudier, notamment sur cultures cellulaires d'embryons de poulets, la protection à l'aide d'immuns-sérums contre l'activité de la N-désacétylthiocolchicine. La technique de culture en flacons à lamelles avec présence d'un tapis unicellulaire de fibroblastes était particulièrement intéressante pour étudier l'action antimitotique de ce produit.

D'autre part, les immuns sérums ont été obtenus en rendant le produit chimique antigénique pour le lapin par diazotation et copulation à des globulines, soit de lapin, soit humaines.

Nous avons été, cependant, obligé de modifier ce mode opératoire, la N-désacétylthiocolchicine n'étant pas directement copulable aux globulines en raison de son groupement aminé fixé sur le noyau B qui n'est pas aromatique. Nous avons alors envisagé la fixation d'un pont para-amino-benzénique amenant un $-NH_2$ suffisamment actif. Diverses solutions ont été envisagées dont deux particulièrement retenues :

utilisation du chlorure de l'acide p. acétamido-benzoïque ou bien du chlorure de l'acide p. acétamido benzène sulfonyl ; c'est ce dernier dérivé qui a servi à la plupart des essais de copulation puis d'immunisation, de toxicité et de protection. Ceci nous a amené, par la suite, à comparer l'activité de trois facteurs :

- la N-désacétylthiocolchicine ;
- son dérivé p. amino-benzène sulfonyl ;
- les azoglobulines préparées à partir de ce dernier.

Nous avons été ainsi conduit à effectuer un travail de chimie imprévu au départ. L'obtention d'une azoglobuline colorée, ce qui ne se produisait pas avec la N-désacétylthiocolchicine, et l'étude comparée des spectres dans l'Infra-rouge de ce produit et du dérivé sulfamidé préparé, indiquent que ce but a été atteint. Ces spectres montrent : l'absence de dénaturation de la molécule, la présence de la fonction sulfamide et une nouvelle bande due au noyau benzénique paradi-substitué (2 CH adjacents) du composé sulfamidé.

Le dérivé p. amino benzène sulfonyl de la N-désacétylthiocolchicine a donc été transformé en azoprotéine selon la technique au nitrite de sodium décrite par Pauly et utilisée à de nombreuses reprises par Landsteiner et son Ecole auxquels nous devons une somme considérable de travaux sur ce sujet. Les globulines de lapins ou humaines ont été préparées selon la méthode de Deutsch, technique simplifiée dérivée de celle de Cohn. Nous avons ainsi obtenu une azoglobuline de teinte brun chamois, dont la coloration est plus accentuée en milieu légèrement alcalin qu'à pH neutre.

Des lots de lapins ont été immunisés à l'aide des ces azoglobulines. Nous avons recherché le mode d'injection et le schéma opératoire capable de produire le taux d'anticorps le plus élevé et nous nous sommes aidés pour cela de l'administration simultanée d'adjuvant complet de Freund.

Le choix des réactions immunologiques destinées à mettre en évidence les anticorps spécifiques formés a été dicté principalement par le caractère de l'antigène employé : l'azoglobuline - celle-ci n'est que très faiblement soluble en milieu aqueux, ce qui exclut l'utilisation des réactions de précipitation classique. Nous avons tenté d'adopter les techniques modernes de diffusion en gélose au cas où l'antigène est peu soluble et diffuse difficilement. Malgré l'utilisation de plusieurs solvants, la dissolution de l'azoglobuline dans le propylène glycol, son incorporation ou non à de la gélose et l'essai de deux techniques récemment décrites, nous n'avons pu résoudre ce problème. Certains auteurs utilisent, en effet, l'immuno-électrophorèse directe en recouvrant la gélose par l'antigène en solution ou encore incorporent à la gélose des substances poly-hydroxylées capables de faciliter la diffusion de tels antigènes. Ces diverses techniques ne nous ont pas apporté d'aide efficace pour le cas envisagé ici.

La réaction de déviation du complément, selon une technique dérivée de Kolmer, nous a cependant permis de mettre en évidence des anticorps spécifiques de l'ensemble de l'azoglobuline, anticorps dits du type "liens". Ces anticorps sont spécifiques du produit chimique étudié car ce dernier inhibe la réaction positive avec l'azoglobuline entière, si l'on a effectué un contact préalable entre l'immun-sérum et ce produit chimique. Le dérivé sulfamidé de la N-désacétylthiocolchicine joue donc le rôle d'haptène inhibiteur, ce qui montre bien la spécificité pour ce produit des anticorps présents dans le sérum des lapins immunisés.

Nous avons pu mettre en évidence un taux d'anticorps, cependant moins élevé, dans le sérum de lapins immunisés à l'aide du dérivé sulfamidé copulé à des globulines de lapin. Cette réaction est positive directement avec l'azoglobuline à une dilution de sérum du 1/10^{ème} alors que dans le cas de l'azoglobuline "humaine", nous avons obtenu des taux allant jusqu'au 1/20 ou au 1/40, selon les cas.

Nous avons donc cherché à mettre en évidence un effet de protection grâce aux sérums de lapins immuns contre l'activité du dérivé sulfamidé de la N-désacétylthiocolchicine. Ces essais ont été effectués selon deux techniques différentes :

- in vivo chez la souris,
- in vitro en cultures cellulaires d'embryons de poulets.

Dans les deux cas, ils ont nécessité l'étude préalable et comparée de la toxicité de chacun des trois produits .

N-désacétylthiocolchicine, dérivé sulfamidé et azoglobuline.

Les résultats obtenus chez la souris ont été les suivants :

- DL 50 de la N-désacétylthiocolchicine : $218 \pm 4,5$ mg/kg;
- de son dérivé : 114 ± 3 mg/kg.

Dans le cas des azoglobulines, la proportion de produit chimique copulé est faible par rapport au poids moléculaire des globulines : on ne peut donc injecter des doses suffisantes et les souris ont très bien supporté des doses de 1 - 2 - 3 et 4 g/kg.

Les représentations graphiques ont été réalisées sur papier logarithme probabilité et les calculs effectués selon la méthode de Miller et Tainter.

L'injection à des souris par voie-intra-péritonéale, trois fois à une semaine d'intervalle de 500 mg/kg de dérivé sulfamidé copulé aux globulines permet d'obtenir une augmentation de la DL 50 du produit sulfamidé qui devient de $147 \pm 3,5$ mg/kg au lieu de 114 ± 3 mg/kg pour des souris non protégées de même provenance et de même poids ($40 \text{ g} \pm 3$). L'utilisation des azoglobulines permet donc d'assurer une protection des souris et il semble bien que celle-ci soit de nature immunitaire car la progression du nombre des morts en fonction de la dose de produit injectée est beaucoup moins régulière, témoignant de variations individuelles dans l'intensité de formation des anticorps.

L'emploi de cultures cellulaires d'embryons de poulets présente de nombreux avantages : il permet non plus seulement l'évaluation d'une toxicité aigüe, mais surtout, pour des doses bien choisies, l'étude des variations cytologiques, cytoplasmiques ou nucléaires, dues au produit étudié. Nous avons utilisé

la culture cellulaire d'embryons de poulets soumis à la trypsinisation et cultivés sur milieu à l'hydrolysate de caséine. L'emploi de flacons à lamelles sur lesquelles se développe un tapis unicellulaire et qui peuvent ensuite être directement colorées dans le flacon et montées sur lames, permet des essais en grande série, comme nous avons dû le faire et un examen comparé des différentes lames dans les meilleures conditions.

Nous avons obtenu :

- aux doses élevées correspondant à des concentrations de 10^{-4} , 10^{-5} pour la N-désacétylthiocolchicine et de 5×10^{-5} pour son dérivé sulfamidé une action toxique intense avec disparition du tapis cellulaire uniforme et continu, caractéristique de la culture de fibroblastes telle qu'on peut l'observer sur les lamelles témoins. Il ne subsiste alors que quelques îlots épars de cellules arrondies, petites, presque dépourvues de cytoplasme, aux noyaux fortement basophiles.

- à des doses moins fortes : on assiste aux modifications nucléaires notamment, beaucoup plus spécifiques du produit étudié et qui ne relèvent plus seulement d'un phénomène de toxicité. On note une atteinte de la multiplication cellulaire avec :

- à un faible grossissement : modification de l'aspect général de la culture : perte de l'aspect rayonnant, symétrique et ordonné, caractéristique et transformation de chaque cellule, qui d'allongée et fusiforme, devient polyédrique ou arrondie ; beaucoup plus petite avec tendance à perdre le contact avec les cellules voisines ;

- à un fort grossissement, on peut détailler les modifications nucléaires et nous avons relevé un certain nombre d'anomalies de la multiplication cellulaire : apparition de prophases de type anormal constituées de chromosomes fractionnés, en chapelets. D'autre part, blocage des mitoses au début de la métaphase caractérisé par la présence de cellules nouvelles, tout à fait typiques : ce sont des cellules, petites, rondes, très fortement basophiles et dans lesquelles la chromatine est condensée, généralement au centre de la cellule, sous forme d'une masse hyperbasophile, pycnotique. Ces cellules correspondent à un blocage des mitoses au stade de la métaphase et constituent jusqu'à 70% des éléments présents pour des concentrations de Désacétylthiocolchicine de 10^{-6} à 10^{-7} , c'est-à-dire 98 à 100%

des cellules en multiplication (fig. 5 et 6). On trouve également ces cellules dans le cas du dérivé sulfamidé mais en nombre plus faible, 50 à 60% des cellules présentes (fig. 8) et dans la proportion d'un tiers environ dans le cas de l'azoglobuline introduite dans le milieu de culture aux doses de 10^{-4} à 10^{-5} (fig. 10).

Ces cellules correspondent donc à un blocage des mitoses sous l'action des produits étudiés et caractérisent ce que certains auteurs ont dénommé la prométaphase pycnotique ou pycnométaphase. Cette action est très nette dans le cas de la N-dé-sacétylthiocolchicine, et légèrement moins prononcée dans le cas de son dérivé sulfamidé. Ce dernier, par contre, présente une toxicité plus élevée. L'action de l'azoglobuline est très voisine de celle observée pour le dérivé sulfamidé, si l'on utilise des concentrations plus élevées, 10^{-4} à 10^{-5} au lieu de 10^{-8} .

Il faut signaler également une altération cellulaire fréquemment rencontrée notamment après action du produit sulfamidé ou de son azoglobuline : il s'agit d'altérations des nucléoles. Les fibroblastes normaux contiennent généralement deux nucléoles punctiformes disposés souvent aux extrémités du noyau. Après action des produits, certains nucléoles prennent un aspect allongé et plus ou moins ramifié, restent aux deux pôles du noyau, ou ressemblent à des chaînettes plus ou moins incurvées, situées au centre du noyau. Cet aspect est plus fréquent dans le cas du dérivé sulfamidé pour des concentrations de 5×10^{-7} et 10^{-8} (fig. 9) ainsi que dans celui de l'azoglobuline pour des concentrations de 10^{-5} (fig. 11).

Les essais de protection en cultures cellulaires d'embryons de poulet, nous ont amené à mettre au point une technique adaptée à ces essais. Nous avons dû tenir compte en effet de ce que le sérum de lapin normal ou immun présente une certaine toxicité pour les cultures cellulaires : pour cela nous avons utilisé ces sérums dilués au 1/5 ou 1/10. Les sérums ont été introduits en même temps que les dilutions de dérivé sulfamidé sur des cultures cellulaires en flacons lamelles (obtenues dans les mêmes conditions que précédemment). Nous nous sommes entouré de témoins de culture cellulaire, de témoins de toxicité, de témoins d'inocuité des sérums de lapin au 1/5 et au 1/10 et de témoins d'activité du sérum de lapin immun : les effets de protection ne sont pas observés en présence d'un sérum de lapin normal. Dans ces conditions, les résultats ont été les suivants :

pour une concentration en dérivé sulfamidé de 10^{-5} on note peu de différence avec les lames de toxicité correspondantes.

par contre, pour les dilutions de 5×10^{-7} et 10^{-8} , si l'action du produit n'est pas totalement supprimée on peut observer une amélioration nette en présence du sérum immun

à un faible grossissement, les lames apparaissent plus riches en cellules; l'aspect est plus uniforme, assez étalé sans "trous" importants dans la culture.

pour des grossissements plus importants, on observe un plus grand nombre de fibroblastes allongés à noyau normal, semblables à ceux des témoins. Les protoplasmes sont également moins souvent atteints et les vacuoles peu nombreuses. Nous n'avons pas noté d'altérations nucléolaires et s'il subsiste encore quelques cellules basophiles à noyau pycnotique, celles-ci sont nettement plus rares, jamais supérieures à une par champ à un grossissement moyen, soit de l'ordre de 5% maximum des cellules totales. D'autre part, on peut noter à nouveau, des figures de mitose normales. On peut donc conclure à un effet de protection appréciable contre l'activité antimototique du dérivé sulfamidé de la N désacétylthiocolchicine.

CONCLUSION

Dans ce travail, nous nous étions proposé d'étudier la possibilité d'immuniser des animaux de laboratoire contre un produit chimique, un dérivé de la série des colchicinaïques, en utilisant la méthode des azoglobulines de Landsteiner. Après mise en évidence des anticorps formés, nous avons cherché à montrer l'effet de protection contre l'haptène chimique de départ, produit grâce aux immuns sérums ainsi obtenus.

Nous avons choisi d'étudier la N-désacétylthiocolchicine comme étant le produit le plus intéressant dans cette série, de par son coefficient thérapeutique, comme l'ont montré les nombreux travaux à ce sujet, de Truhaut et coll. De plus l'examen des propriétés antimitotiques de ce produit pouvait être effectué de façon plus particulièrement satisfaisante sur cultures cellulaires d'embryons de poulets. La technique en flacons à lamelles, telle qu'elle a été mise au point par German et coll. permet des essais de grande série, indispensables vu l'ampleur prise par ces expériences; l'obtention d'une couche unicellulaire de fibroblastes facilite considérablement l'examen microscopique des altérations aussi bien nucléaires que cytoplasmiques.

Nous avons dû cependant modifier légèrement ce plan, la N désacétylthiocolchicine n'étant pas directement copulable aux globulines, par la technique envisagée, en raison de son groupement aminé fixé sur un noyau non aromatique. Nous avons alors préparé le dérivé p amino benzène-sulfonyl de la N désacétylthiocolchicine, qui apporte un NH_2 suffisamment actif, diazotable et copulable à des globulines de lapin ou humaines par exemple. Ceci nous a amené à comparer, par la suite, l'activité de trois facteurs.

- la N-désacétylthiocolchicine,
- son dérivé p. amino-benzène-sulfonyl,
- l'azoglobuline préparée à partir de ce dernier.

Des injections répétées en présence d'adjuvant de Freund de cette azoglobuline à des lots de lapins provoquent la formation d'anticorps mis en évidence par la réaction de déviation du complément. Ces taux d'anticorps sont plus élevés si l'on utilise un produit copulé à des globulines étrangères, globulines humaines par exemple.

L'antigène-azoglobuline nous a permis d'obtenir par vaccination un certain taux de protection chez la souris puisque la DL 50 du dérivé sulfamidé, effectuée sur des lots de souris identiques et de même provenance est de 114 ± 3 mg/kg pour des animaux neufs et de $147 \pm 3,5$ mg/kg dans le cas des souris protégées par injections préalables d'azoglobuline.

Sur cultures unicellulaires de fibroblastes d'embryons de poulets, après étude de la toxicité et de l'activité antimitotique de chacun de ces produits, nous avons pu montrer que les anticorps produits chez le lapin permettent d'obtenir un effet de protection appréciable contre l'activité antimitotique du dérivé sulfamidé de la N-désacétylthiocolchicine.

Les résultats ainsi obtenus nous semblent donc intéressants à la fois du point de vue immunologique et en ce qui concerne la toxicité et l'activité antimitotique des dérivés de la colchicine. Cependant étant donné l'importance de la nature de l'effecteur, et son rôle primordial susceptible d'influencer, considérablement les résultats, il serait peut-être intéressant de voir si l'on obtient des conclusions du même ordre en utilisant cette fois la cellule végétale, comme substrat. D'autre part, on peut se demander si la diminution de toxicité du dérivé colchicinique, observée par injection préalable de son azoglobuline, permettrait d'améliorer le coefficient thérapeutique de ce produit ou si son activité antimitotique serait également atteinte.

Les recherches pourraient être poursuivies dans ce sens. Cependant, les résultats que nous avons obtenus et qui font l'objet de ce travail, montrent déjà l'intérêt qui s'attache à la considération des aspects immunologiques des problèmes de toxicité.

Vu, le Président de Thèse

Vu, le Doyen de la Faculté

R. TRUHAUT.

G. VALETTE

Vu et Permis d'Imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris

J. ROCHE

BIBLIOGRAPHIE

- (1) - BASSET A. et MONFORT J. (1955)
 "Essais de traitement local des épithéliomas basocel-
 lulaires par un nouveau dérivé de la colchicine"
 Bull. Soc. Franç. Derm. 62. 53-54.

- (2) - BEISER S.M., ERLANGER B.F. and coll. (1959)
 "Antigenicity of steroid-protein conjugates"
 Science 129, 564

- (3) BELLAMY L.J. (1954)
 "The infra red spectra of complex molecules"
 Methuen and co. Ltd. London - John Wiley and Sons Inc.
 Ed.

- (4) - BETZ A. et MAURIN J. (1958)
 "Appareil à trypsination continue"
 Ann. Int. Pasteur 95, 224 - 227.

- (5) - BODIAN D. (1956)
 "Simplified method of dispersion of monkey kidney cells
 with trypsin".
 Virology 4, 575-577.

- (6) - BOERNER F. and LUKENS M. (1937)
" A method for determining the optimum dose and sensitivity of antigens used in the Wasserman test".
Am. J. Clin. Path. 7, 33.
- (7) - BOURDIN J.S. et SARACINO R.T. (1959)
"Les essais thérapeutiques en cancérologie"
G.M. de France 66, 1405-1430.
- (8) - BOYD W.C. (1962)
"Introduction to immunochemical specificity."
Interscience N.Y. - London.
- (9) - BRANCENI D., PETERFALVI M. et JEQUIER R. (1956)
"La N-désacétylthiocolchicine, étude expérimentale des propriétés antimitotiques".
Arch. Intern. Pharmac. et Therap. 107, 150-158.
- (10) - CROWLE A.J. (1961)
"Immunodiffusion"
Academic. Press. N.Y. and London.
- (11) - DANIEL Ph. et DEPOUX R. (1957)
"La dispersion des cellules par trypsination à basse température"
Ann. Inst. Pasteur 92, 703-704
- (12) - DEUTSCH H. (1952)
"Separation of antibody active proteins from various animal sera by ethanal fractionation technique".
Methods in Medical Research 5, 284-300.
- (13) - DEYSSON G. (1948)
Contribution à l'étude du "syndrome mitoclasique".
Thèse Doct. Pharm. (Etat). Paris, 1948.
- (13b) - DEYSSON G. (1956)
Les facteurs de la mito-inhibition végétale.
Exp. Act Biol. Cell. 1956 2 241-274. Masson Ed. Paris

- (14) -- DEYSSON G. et TRUHAUT R. (1960)
 "Etude, sur la cellule végétale, des propriétés anti-
 mitotiques, des principaux types de composés doués
 d'activité antitumorale".
 Ed. du C.N.R.S. 223-234.
- (15) -- DUSTIN A.P. (1934).
 "Contribution à l'étude de l'action des poisons caryo-
 clasiques sur les tumeurs animales - action de la
 colchicine sur le sarcome greffé type Crocker, de la
 souris".
 Bull. Acad. Roy. de Méd. de Belgique 14, 487-502.
- (15b) -- EIGSTI O.J. and DUSTIN Pierre (1955)
 Colchicine in agriculture, medicine, biology and che-
 mistry.
 Ames, Iowa, The Iowa State College Press.
- (16) -- EISEN H.N. and KARUSH F. (1949)
 "The interaction of purified antibody with homologous
 haptens. Antibody valence and binding constant".
 J. Am. Chem. Soc. 71, 363-364.
- (17) -- EISEN H.N., KERN M. and coll. (1959)
 "A study of the distribution of 2-4 dinitrobenzene
 sensitizers between isolated lymph node cells and
 extracellular medium in relation to induction of con-
 tact skin-sensitivity".
 J. Exp. Med. 110, 187.
- (18) -- ERLANGER B.F., BOREX and coll.
 "Steroid-protein conjugates"
 (1957) -- J. Biol. Chem. 228 -- 713
 (1959) -- J. Biol. Chem. 234 -- 1090
- (19) -- FARAH F.S., KERN M. and EISEN H.N. (1960)
 "The preparation and some properties of purified anti-
 body specific for the 2-4 dinitrophenyl groups"
 J. Exp. Med. 112, 1195-1210.

- (20) - FREUND J., CASALS J. and HOSMER E.P. (1937)
"Sensitization and antibody formation after injection
of tubercule bacilli on paraffin oil"
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 37, 509-513.
- (21) - FREUND J., THOMSON K.J. and HOUGH (1948)
"Antibody formation and sensitization with the aid of
adjuvants"
J. Immunol. 60, 383-398.
- (22) - GELL P.G.H., HARRINGTON C.R. and coll. (1946)
"The antigenic function of simple chemical compounds:
production of precipitins in rabbits".
Brit. J. Exp. Path. 27, 267-286.
- (23) - GERMAN A., PANOUSE-PERRIN J. et PAUTY A.M. (1961)
"Emploi de cultures de fibroblastes d'embryons de pou-
lets pour l'étude de l'action cytotoxique de quelques
médicaments".
Ann. Pharm. Franç. XIX - 633.
- (24) - GCEBEL W.F. and AVERY O.T. (1931)
"Chemo-immunological studies on conjugated carbohy-
drate-proteins (type III Pneumococcus)
J. Exp. Med. 54, 431 et 437-447.
- (25) - GOODFRIEND L., SEHON A.H. and coll. (1961)
"Antibodies to Estrone-protein conjugates"
Canad. J. Biochem. 39, 941
- (26) - GRABAR P. et WILLIAMS C.A. (1953)
"Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés
électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange
de protéines. Applications au sérum sanguin".
Biochem. Biophys. Acta 10, 193-194.
- (27) - GRABAR P. et WILLIAMS C.A. (1955)
"Méthode immuno-électrophorétique d'analyse de mélan-
ges de substances antigéniques".
Biochem. Biophys. Acta 17, 67-74.

- (28) De GRACIANSKY P. et GRUPPER Ch. (1955)
 "Essai de traitement local des épithéliomas cutanés
 (baso-cellulaires) par la N-désacétylthiocolchicine"
 Bull. Soc. Franç. Derm. 62, 54-55
- (29) GRASSET E., PONGRATZ E. et BRECHBUHLER T. (1956)
 "Analyse immuno-chimique des constituants des venins de
 serpents par la méthode de précipitation en milieu
 gélifié"
 Ann. Inst. Pasteur 91, 162.
- (30) GUY J. (1956)
 "Applications analytiques quantitatives de la spectro-
 photométrie infra-rouge"
 Techn. Pharm. 1956, 1
- (31) HARTMANN L. et TOILLIEZ M. (1957)
 "Microméthode d'étude en gélose de la réaction anti-
 gène-anticorps (variante du procédé d'Ouchterlony).
 Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 2, 197-199.
- (32) HEIDELBERGER and KENDALL F.E. (1929)
 "Reaction between proteins and diazotized aromatic
 amines in neutral solution"
 Proc. Soc. Exp. Biol. 26, 482.
- (33) HEIDELBERGER M. and KENDALL F.E. (1931)
 "Specific and non-specific polysaccharides of type IV .
 Pneumococcus
 "J. Exp. Med. 53, 625
- (34) HEITFUSS R., BUCHANAN-DAVIDSON D.J. and coll. (1959)
 "The stabilization of extracts of cabbage leaf proteins
 by polyhydroxy compounds for electrophoretic and im-
 munological studies
 Arch. Biochem. Biophys. 85 200-208
- (35) - HUANT E (1955)
 "Action antitumorale d'un dérivé hypotoxique de la
 colchicine : la N-désacétylthiocolchicine - Etude
 clinique et premiers résultats thérapeutiques".
 Thérapie 10, 448-456

- (36) HUGUENIN R., TRUHAUT R. et coll. (1953)
Recherche sur la potentialisation réciproque des effets des rayons X et d'un composé de la série des moutardés, la $\beta\beta'\beta''$ trichloréthylamine.
Thérapie 8 I-9
- (37) HUGUENIN R. et SARACINO R. (1953)
Chimiothérapie du cancer - Encyclopédie médico-chirurgicale. Paris.
- (38) HUGUENIN R., TRUHAUT R. et SARACINO (1955)
"Premiers résultats de l'utilisation en chimiothérapie anticancéreuse d'un dérivé de la colchicine : la N-désacétylthiocolchicine"
Bull. Ass. Franç. Cancer 42, 308-325.
- (39) JANBON M. et FLANDRE O. (1959)
"Intérêt des cultures de tissus en recherche thérapeutique"
Bull. Soc. Sci. Med. Biol. Montpellier 30.1.1959.
- (40) JEQUIER R. BRANCENI D. et PETERFALVI M. (1955)
"Activité antimitotique et toxicité de quelques dérivés de la colchicine et de la thiocolchicine"
Arch. Int. Pharmacodyn. 103, 243-253
- (41) JEQUIER R. BRANCENI D. et PETERFALVI M. (1958)
"Activité antimitotique et toxicité de quelques osides de la N-désacétylthiocolchicine"
Arch. Int. Pharmacodyn. 114, 435-438.
- (42) KABAT E.A. and MAYER M.M. (1961)
"Experimental immunochemistry"
2e Edition - Thomas Editor.
- (43) KARUSH F. (1956-1957)
"The interaction of purified antibody with optically isomeric haptens"
J. Am. Chem. Soc. 78, 5519-5526 - 79, 3380-3384
- (44) KARUSH F. and EISEN H N (1962)
"A theory of delayed hypersensitivity"
Science 136, 1032.

- (45) KLOPSTOCK A., PINTO M. and RIMON A. (1964)
 "Antibodies reacting with steroid haptens"
J. Immunol. 92, 515-520

- (46) - KOLMER J.A. (1922)
 "A new complement fixation test for syphilis based upon the results of studies in the standardization of technic".
Am. J. Syph. 6, 669.

- (47) - KOLMER J.A. (1935)
 "New antigens for the Kolmer modification of the Wassermann test"
Am. J. Clin. Path. 5, 55.

- (48) KOLMER J.A. and BOERNER F. (1941)
 Approved Laboratory Technic 3e edition Ch. 29 N.Y.

- (49) ... LANDSTEINER K. and VAN DER SCHEER J. (1927)
 "On the influence of acid groups on the serological specificity of azoproteins."
J. Exp. Med. 45, 1045-1056.

- (50) LANDSTEINER K. and VAN DER SCHEER J. (1932)
 "Serological reactions with simple chemical compounds"
J. Exp. Med. 56, 399-409

- (51) LANDSTEINER K. and VAN DER SCHEER J.
 "On the serological specificity of peptides"
J. Exp. Med. 55, 781-796 (1932)
J. Exp. Med. 59, 769-780 (1934).

- (52) LANDSTEINER K. and VAN DER SCHEER J. (1934)
 "Serological studies on azoproteins. Antigens containing azocomponents with aliphatic side chains".
J. Exp. Med. 59, 751-768.

- (53) LANDSTEINER K. and VAN DER SCHEER J.
 "On cross reactions of immune sera to azoproteins"
J. Exp. Med. 63, 325-339 (1936)
J. Exp. Med. 67, 709-723 (1938)

- (54) - LANDSTEINER K. (1945)
"The specificity of serological reactions".
Cambridge, Harvard University Press. Ed.
- (55) - LANDSTEINER K. (1962)
"The specificity of serological reactions".
Dover Publications N.Y.
- (56) - LEITER J., SHEAR N.J. and coll. (1953)
"Damage induced in sarcoma 37 with chemical agents".
J. Nat. Cancer Inst. 14, 365.
- (57) - LENTI G., TARTAROLO E., VAGLIO G. and coll. (1955)
"Action de la désacétylthiocolchicine sur culture de
fibroblastes in vitro".
Minerva Medica 46, 13-18.
- (58) - LEPINE P., SLIZEWICZ P. et coll. (1956)
"Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hy -
drolysate de caséine comme source d'acides aminés".
Ann. Inst. Pasteur 90, 654-656
- (59) - LEPINE P., DANIEL Ph. et coll. (1957)
"Besoins nutritifs des cellules rénales de singe et
des cellules de la souche Hela cultivées in vitro".
Ann. Pasteur Inst. 92, 567-575.
- (60) - LETTRE H. (1952)
"Chemische und biologische Untersuchungen über Mito -
segifte"
Scientia Pharmaceutica 30, 75-100.
- (61) - Mc. MASTER L. and AHMANN F.F. (1928)
"Action of thionyl chloride on organic acids"
Am. Chem. Soc. 50, 145-149.
- (62) - MAURER Ph. and coll. (1959)
"Antigenicity of polypeptides" (polyalpha-aminoacids)
J. Immunol. 83, 193-197.
- (63) - MAURER Ph., GERULAT and PINCHUCK P. (1963)
"Antigenicity of polypeptides (polyalpha-amino-acids)"
J. Immunol. 90, 381-398

- (64) MILLER L. C. and TAINTER N. L. (1944)
Estimation of the ED 50 and its error by means of logarithmic-probit graph paper
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 57 261-264
- (65) MULLER G. et VELLUZ L. (1955)
Sur l'emplacement du carbonyle troponique dans la colchicine.
Bull. Soc. Chim. Fr. p.1452-1454.
- (66) NISONOFF A. and PRESSMAN D. (1958)
Heterogeneity and average combining constants of antibodies from individual rabbits.
J. Immunol. 80 417-428.
- (67) ONOVE K., YAGI Y. and PRESSMAN D. (1964)
"Multiplicity of antibody proteins in rabbit anti-azobenzene arsonate sera"
J. Immunol. 92, 173-184.
- (68) OUCHTERLONY O (1948)
"Antigen antibody reactions in gels"
Arkiv. Kemi, Mineral. Geol. 25 (B) 14
- (69) PAULING L., PRESSMAN D. and coll. (1942)
"The effects of changed conditions and of added haptens on precipitation reactions of polyhaptenic simple substances"
J. Am. Chem. Soc. 64, 3003-3009.
- (70) PAULING L., PRESSMAN D. and GROSSBERG A. (1944)
"A quantitative theory of the inhibition by the precipitation of heterogeneous antisera with antigens and comparaison with experimental results for polyhaptenic simple substances for azoproteins."
J. Am. Chem. Soc. 66 784-792
- (71) PAUTY A. M. (1961)
"Cultures de fibroblastes d'embryon de poulet."
Thèse Doct. Pharm. Univers. Paris

- (72) PEPE F. and SINGER S.J. (1959)
 "The reaction of a univalent protein antigen with antibody"
J. Am. Chem. Soc. 81, 3878-3887.
- (73) - RAPPAPORT Ph.D. (1956)
 "Trypsination of monkey kidney tissue : an automatic method for the preparation of cell suspensions".
Bull. Org. Mond. Sante 14, 147-166.
- (74) - RAVINA A. et ELOY Ph. (1961)
 "Etat actuel de la chimiothérapie anticancéreuse : la N-désacétylthiocolchicine".
P.M. 69, 587-590.
- (75) - SANTAVY F., WINKLER R. und REICHSTEIN T. (1953)
 Zur constitution von Demecolcin (Substanz F) aus colchicum autumnale L.
Helv. Chim. Acta 36 VI, 1319-1324.
- (76) SCHEIDEGGER J.J. et BUZZI C. (1957)
 "Etude immuno-électrophorétique des gamma-globulines. Identification de plusieurs déterminants antigéniques grâce aux protéines de Bence-Jones et aux sérums de myélomes".
Rev. Franç. Et. Clin. et Biol. 2, 898-906.
- (77) SCHEIDEGGER J.J. et BUZZI C. (1957)
 "L'analyse immuno-électrophorétique des liquides biologiques"
Bull. Soc. Chim. Biol. 39, suppl. 1 45-63
- (78) SENTIN P. (1956)
 Action de la N désacétylthiocolchicine sur la mitose dans l'oeuf en segmentation, la larve et la spermatogénèse de *Triturus helveticus*.
C.R. Soc. Biol. 4, 1597-1599.
- (79) SINGER S.J. and CAMPBELL D.H. (1952)
 "Physical chemical studies of soluble antigen-antibody complex"
J. Am. Chem. Soc. 74, 1794-1802.

- (80) STAHMANN M.A., LAPRESLE C. and coll. (1959)
 "Immunochemistry of synthetic polypeptides and polypeptidyl proteins".
J. Immunol. 83, 534-542
- (81) - STAHMANN M.A., BUCHANAN - DAVIDSON D.J. and coll. (1959)
 "Immunochemical studies of polypeptidyl proteins and synthetic polypeptides".
Nature 184, 549-550
- (82) - TRAN BA LOC (1959)
 Thèse Doct. ès Sciences - PARIS.
- (83) - TRUHAUT R. (1952)
 "Tendances actuelles des recherches de chimiothérapie des états cancéreux"
 Actualités pharmacologiques 1952, 5ème série - Ed Masson et Cie.
- (84) - TRUHAUT R. (1954)
 Einige Forschungsrichtungen der chemotherapeutischen Krebsbekämpfung Chemische und pharmakologische Grundlagen.
 Die Therap. Woche 4, 414-418.
- (85) TRUHAUT R. et DEYSSON G. (1959)
 Contribution à l'étude de l'activité mitoclasique dans la série de la colchicine. I Dérivés de l'aminocolchicide (colchaminones ou colchicamides)
 II Désacétylthiocolchicine et dérivés aminés.
Ann. Pharm. Franç. 14 241-262.
- (86) - TRUHAUT R. et DEYSSON G. (1956)
 "Contribution à l'activité mitoclasique dans la série de la colchicine - III thiocolchicine et N-désacétylthiocolchicine,
Ann. Pharm. Franç. 14, 416-425.
- (87) - TRUHAUT R. et SARACINO R. (1956)
 "Action de la N-désacétylthiocolchicine sur les affections néoplasiques malignes".
Giornale Italiano de chemioterapia 3, 434-455.

- (88) - TRUHAUT R. et SARACINO R. (1957)
 "Place de la N-désacétylthiocolchicine dans la chimiothérapie antitumorale
Acta Un. contra cancer. 13, 431-441.
- (89) - TRUHAUT R. et SARACINO R. (1957)
 "Action de la N-désacétylthiocolchicine sur les tumeurs malignes et particulièrement sur les leucémies myéloïdes.
P.M. 65, 51.
- (90) - TRUHAUT R. et PAOLETTI Cl. (1959)
 "Essais de nouveaux dérivés de la colchicine sur des tumeurs expérimentales greffées.
Bull. du Cancer 46, 746-755.
- (91) - VALETTE G. (1964)
Précis de Pharmacodynamie - Masson et Cie Ed.
- (92) - VELLUZ L. et MULLER G. (1954)
 "La thiocolchicine"
Bull. Soc. Chim. Fr. 6 755-758.
- (93) - VELLUZ L. et MULLER G. (1954)
 "La thiocolchicine II. Produits d'hydrolyse, de réduction et d'oxydation avec exemple de soufre asymétrique".
Bull. Soc. Chim. Fr. 9, 1072-1075.
- (94) - VERNE J. et VILTER V. (1940)
 "Etude de l'action de la colchicine sur les mitoses de fibroblastes cultivés in vitro".
C.R. Soc. Biol. 133, 618-624.
- (95) - YUKIMASA Hirata and BLUMENTHAL H.T. (1962)
 "Precipitation of insulin with sera of insulin-treated guinea pigs and rabbits"
J. Lab. and Clin. Med. 60, 194-211.
- (96) - WILSON A.T. (1964)
 "Direct immuno-electrophoresis"
J. Immunol. 92, 431-434

TABLE DES MATIERES

	Pages
Introduction	1
I - Partie chimique :	
Préparation d'un dérivé de la N-désacétylthio- colchicine diazotable et copulable à des glo- bulines	15
II - Immunisation des animaux de laboratoire	30
III - Mise en évidence des anticorps formés :	
1. Techniques immunochimiques en gélose	35
2. Réactions de déviation du complément	41
IV - Effet de protection à l'aide des anticorps formés	
1 Essais de protection in vivo chez la souris	
Détermination de la DL 50 chez la souris pour chacun des trois produits étudiés ..	50
Détermination de la DL 50 chez les souris immunisées	58

2. Essais de protection sur cultures cellulaires d'embryons de poulets :	
- Technique des cultures cellulaires	62
- Essais de toxicité des produits étudiés ...	71
- Essais de protection à l'aide d'immun-sérums de lapin	78
Discussion des résultats	87
Conclusion	94
Bibliographie.....	97

